

München, 1960

**Zum biologischen Abbau
des Nikotins**

HORST EBERWEIN

Zum biologischen Abbau des Nikotins

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt

von

Horst Eberwein

aus

München

1960



5349/60

Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen

Tag der mündlichen Prüfung: 24. FEB. 1960

Druck: Steinbauer u. Hagemann
München 2

Meinen lieben Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1956 bis Juli 1959 am Max-Planck-Institut für Zellchemie in München ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. F. Lynen

danke ich herzlich für die Unterstützung und das Interesse, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

An dieser Stelle möchte ich auch

Herrn Prof. Dr. F. Kuffner

für die Überlassung wertvoller Alkaloidpräparate danken.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Einleitung und Problemstellung</u>	1
 <u>Ergebnisse</u>	
I. <u>Das System der Nikotinoxydation</u>	4
1. Nikotinabbau in intakten Zellen	4
2. Nikotinabbau im zellfreien Extrakt	5
a. Manometrische Versuche	5
b. Kolorimetrische Versuche	8
3. Optischer Test für die Nikotinoxydation	9
a. Die kolorimetrische Reaktion	9
b. Substratabhängigkeit	9
c. Enzymabhängigkeit	11
d. pH-Abhängigkeit	13
4. Reinigung des Systems der Nikotinoxydation	16
a. Aufschluss der Bakterien	16
b. Fraktionierte Protaminfällung	16
c. Geladsorption	17
d. Fraktionierung mit Ammoniumsulfat	17
5. Stöchiometrie und Kinetik der Nikotinoxydation	18
a. mit dem Rohextrakt	18
b. mit dem gereinigten Enzymsystem	19
 II. <u>Zwischenprodukte des biologischen Nikotinabbaus</u>	21
1. Die Entdeckung der Zwischenprodukte	21
2. Das Produkt A	23
a. Isolierung und Kristallisation	23
b. Eigenschaften	23
c. Identifizierung	24
d. Stereospezifität der enzymatischen	26
6-Hydroxynikotin-Bildung	
e. 6-Hydroxynikotin als Zwischenprodukt des	27
Nikotinabbaus	

	Seite
3. Das Produkt B	27
a. Die Entdeckung	27
b. Isolierung	30
c. Eigenschaften	30
d. Prüfung, ob bei der Bildung des Produkts B Ammoniak abgespalten wird	31
e. Die Stereospezifität der Reaktion	32
f. Extinktionskoeffizient des Produkts B	33
4. Das Produkt C	34
a. Isolierung und Kristallisation	34
b. Eigenschaften	35
α) spektrale Eigenschaften	35
β) chemische Eigenschaften	36
c. Prüfung, ob bei der Bildung des Produkts C Ammoniak abgespalten wird	38
III. <u>Zur Reaktionsfolge der Teilschritte im Nikotinabbau</u>	39
1. 6-Hydroxynikotin als Zwischenprodukt der Nikotinoxydation	39
2. Die Verbindung B als Zwischenprodukt der Nikotinoxydation	40
3. Die Oxydation des Produkts B mit Sauerstoff	41
4. Die Nikotinoxydase als System mehrerer Enzyme	45
5. Zur Stereospezifität der Nikotinoxydation	45
IV. <u>Die Substratspezifität des Systems der Nikotinoxydation</u>	47
1. Versuche mit intakten Bakterien	47
2. Substratspezifität des gereinigten Enzymsystems	48
V. <u>Diskussion</u>	58
<u>Methoden</u>	66
1. Züchtung der Bakterien im Grossansatz	66
2. Herstellung von zellfreiem Extrakt	67
a) durch Aufschluss der Bakterien mit Aluminiumoxyd	67
b) durch Aufschluss mit dem mechanischen Zell- homogenisator	67

	Seite
3. Optischer Test der Nikotinoxydation	68
4. Reinigung des Systems der Nikotinoxydation	68
a) Fraktionierte Protaminsulfatfällung	68
b) Geladsorption	69
c) Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	69
5. Papierchromatographie	69
6. Isolierung und Kristallisation des Produkts A	71
7. Chemische Synthese von 6- und 2-Hydroxynikotin	71
a) Darstellung von 6- und 2-Aminonikotin	71
b) Darstellung von 6- und 2-Hydroxynikotin	72
8. Razemisierung von 1-Nikotin	73
9. Isolierung des Produkts B	73
10. Modifikation der Mikrobestimmung von Ammoniak nach Conway	73
11. Isolierung und Kristallisation des Produkts C	74
12. Freisetzung der Alkaloidbasen aus kleinsten Mengen ihrer Pikrate	76
13. Chemische Synthese von N-Methylmyosmin	76
a) Darstellung von 1-Methyl-3-Nikotinoyl-2-Pyrrolidon	76
b) Umsetzung zu N-Methylmyosmin	77

<u>Zusammenfassung</u>	77
------------------------	----

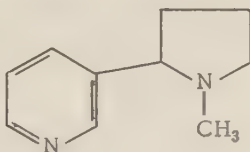
<u>Literaturverzeichnis</u>	79
-----------------------------	----

Einleitung und Problemstellung

Der biologische Abbauweg des Nikotins ist aus mehreren Gründen von Interesse.

Pharmakologisch bedeutsam ist die Tatsache (2), dass der menschliche Körper nur maximal 10% des beim Rauchen aufgenommenen Nikotins unverändert wieder ausscheidet. Der Rest wird - besonders in der Leber - oxydativ abgebaut. Über den Abbauweg ist nichts mit Sicherheit bekannt.

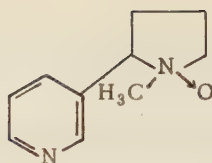
Für die Tabakindustrie sind die Zwischenprodukte des Nikotinabbaus und ihre Entstehung bei der Fermentation der Tabakblätter von grosser Wichtigkeit, da sie entscheidend die Qualität des Tabaks beeinflussen können. Viele neuere Arbeiten (3, 4, 5, 6) befassen sich daher mit den aus fermentierten Tabakblättern isolierbaren Produkten des Nikotinabbaus. Auch die Stoffwechselprodukte von Bakterien, die an Tabaksamen haften und Nikotin verwerten können, wurden studiert (7, 8, 9). Schliesslich ist es von wissenschaftlichem Interesse zu sehen, auf welche Weise die Natur imstande ist, das Doppelringssystem des Nikotins



zu öffnen und die Reaktionsprodukte den grossen Abbauwegen der Kohlenstoffverbindungen in der Zelle zugänglich zu machen. Zu diesem Zweck wurden Mikroorganismen gesucht und gefunden (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18), welche Nikotin bzw. die zu untersuchenden Zwischenprodukte abzubauen vermögen und dabei neue Zwischenstoffe bilden.

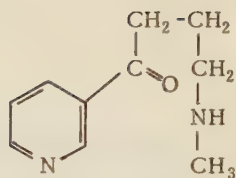
Die bei den verschiedenen Fragestellungen entdeckten und in ihrer Konstitution aufgeklärten Verbindungen sind in der folgenden Tafel (s. S. 2) zusammengefasst.

Es liegt natürlich nahe und es ist oft versucht worden (4, 12, 10, 16), auf Grund der chemischen Konstitution dieser Verbindungen, Hypothesen über die Reaktionswege des Nikotinabbaus aufzustellen. Der Wert solcher Schemata ist aber fragwürdig, da die wirklich biologisch aktiven Zwischenstoffe selten von den komplexen Systemen wie den genannten ausgeschieden werden.

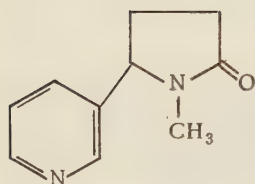


Oxynikotin (4)

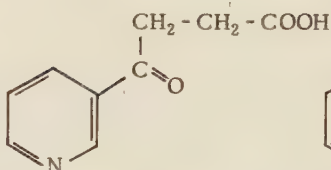
bzw.



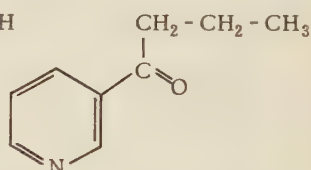
Pseudooxynikotin (12)



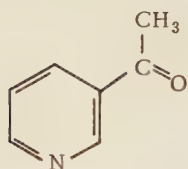
Cotinin (5)



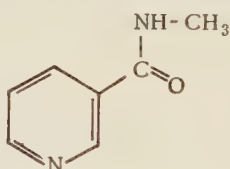
3-Succinoylpyridin (15)



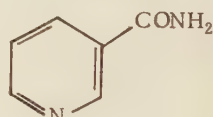
3-Pyridylpropylketon (4)



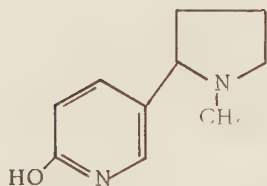
3-Pyridylmethyleketon (4)



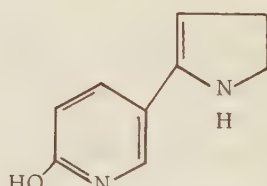
N-Methylnikotinamid (4)



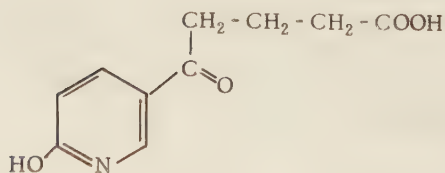
Nikotinsäureamid (4)



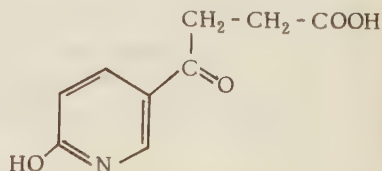
6-Hydroxynikotin (7)



6-Hydroxymyosmin (15)



3-Glutaryl-6-Hydroxypyridin (15)



3-Succinoyl-6-Hydroxypyridin (7, 11, 16)

Aus diesem Grund schien es wünschenswert, einfache Enzymsysteme und reine Enzyme aus den genannten komplexen Systemen zu isolieren und mit diesen die Bildung der Zwischenprodukte und die einzelnen Reaktionen des Abbauwegs des Nikotins zu studieren.

Eine grosse Hilfe für diesen Plan war, dass bereits in einer vorausgehenden Arbeit (1) aus Bodenproben ein Bakterienstamm *Arthrobakter oxydans* isoliert worden war, der auf Nikotin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle zu wachsen vermag. 30% des assimilierten Nikotins werden dabei in einen tiefblauen Farbstoff umgewandelt^{x)}.

Das Problem der Reaktionsfolge im Nikotinabbau wurde mit Hilfe von zellfreien Extrakten und angereicherten Enzymen aus *Arthrobakter oxydans* in Angriff genommen. Die Ergebnisse meiner Untersuchungen sind im folgenden wiedergegeben.

^{x)} Auf Glucose und Ammoniumsulfat gezüchtet wächst der Stamm ohne Farbstoffbildung.

I. Das System der Nikotinoxydation

1. Nikotinabbau in intakten Zellen

Schüttelt man die frisch geernteten und gewaschenen Bakterien mit Nikotin in Warburggefäßen mit Manometern, so beobachtet man eine kräftige Sauerstoffaufnahme, deren Geschwindigkeit von der Nikotinkonzentration abhängt (Abb. 1).

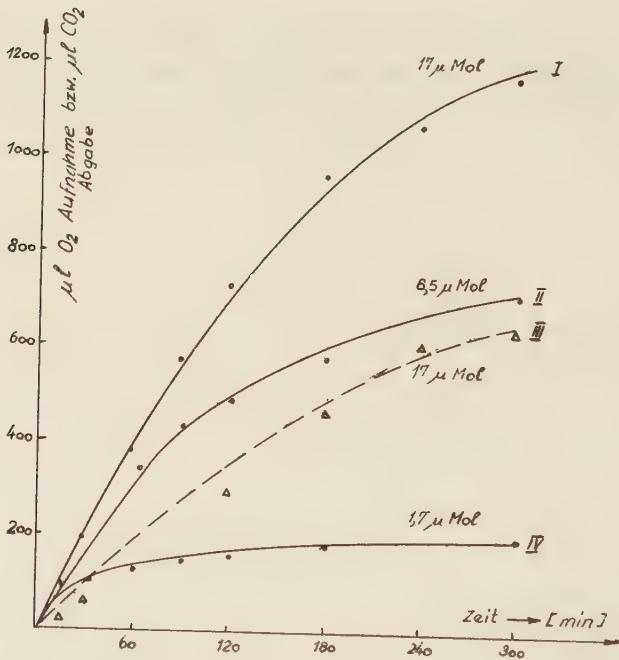


Abb. 1 Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxydabgabe bei der Nikotinoxydation

Zuss.: Hauptraum: 2.0 ml Bakteriensuspension.

Seitenarm: 0.2 ml Nikotin, Konzentration wie angegeben.

Einsatz mit und ohne KOH 0.15 ml, 4m,

T = 30°C.

Kurve I, II und IV = O₂ - Aufnahme,

Kurve III = CO₂ - Abgabe

Der Kohlenstoff des Nikotin wird dabei nur teilweise bis zur Stufe des Kohlendioxyds oxydiert, wie man aus der beobachteten CO_2 -Abgabe sieht. Der respiratorische Quotient $Q = \text{CO}_2 \text{ abgegeben} / \text{O}_2 \text{ aufgenommen}$ beträgt bei den kräftig Nikotin veratmenden Bakterien etwa 0.42. Manometrische Versuche zur Stöchiometrie der Nikotinoxidation mit intakten Zellen ergaben, dass bei einer Oxydation von $8.5 \mu\text{M}$ 1-Nikotin $48 \mu\text{M}$ Sauerstoff aufgenommen werden, d.h. pro Mol 1-Nikotin werden 5.6 Mol Sauerstoff verbraucht.

2. Nikotinabbau im zellfreien Extrakt

a. Manometrische Versuche

Das Arbeiten mit zellfreiem Extrakt aus den Bakterien erschien mir der einfachste Weg zur Aufklärung der bei der Oxydation des Nikotins ablaufenden Reaktionen.

Hierfür wurden die gewaschenen Bakterien mit Aluminiumoxydpulver verrieben und die erhaltene Paste mit 0.05M Phosphatpuffer pH 7.5 extrahiert und schliesslich das Aluminiumoxyd, noch intakte Bakterien und Zelltrümmer durch 5 Minuten langes Zentrifugieren bei 22 000 g abgetrennt. Der so erhaltene dunkelgelbe Rohextrakt enthielt etwa 7 mg Protein/ml.

Inkubiert man diesen Zellextrakt in Warburggefässen mit Nikotin, so wird im Gegensatz zu den Versuchen mit intakten Bakterien nur sehr wenig Sauerstoff aufgenommen (vgl. Kurve 1 in Abb. 2). Allerdings war nach allgemeinen Erfahrungen zu erwarten, dass durch den Aufschluss die strukturgebundenen Enzyme, welche den Sauerstoff für die bei den Abbaureaktionen des Nikotins freiwerdenden Reduktionsäquivalente verfügbar machen, zerstört oder abgetrennt werden.

Entsprechend den klassischen Versuchen von H. WIELAND und T. THUNBERG gab ich daher als Katalysator der Sauerstoffübertragung eine kleine Menge des autoxydablen Redoxfarbstoffs Methylenblau in die Manometergefässe. Wie Kurve 2 in Abb. 2 zeigt, erfolgt unter diesen Bedingungen eine rasche Sauerstoffaufnahme, die erst nach Verbrauch des zugesetzten Nikotins aufhört.

Dabei werden für $0.85 \mu\text{M}$ 1-Nikotin $2.14 \mu\text{M}$ Sauerstoff aufgenommen und für $1.7 \mu\text{M}$ 1-Nikotin entsprechend $4.1 \mu\text{M}$ O_2 .

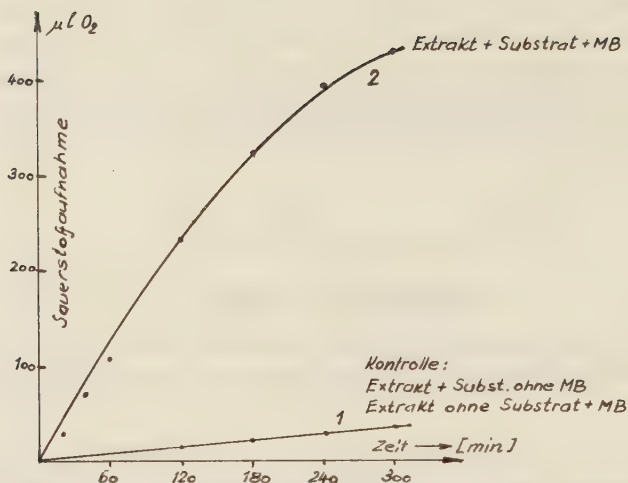


Abb. 2 Nikotinoxydation mit dem zellfreien Extrakt

Zuss.: Hauptraum: 0,5 ml Bakterienextrakt
1 μM Methylenblau bzw. ohne

Seitenarm: 0,85 μM 1-Nikotin
30 μM Phosphatpuffer pH 6,3

Zentralgefäß: 0,15 ml 4m KOH.

Ges. Vol. = 2,2 ml

T = 30°C

Im Gegensatz zu den Versuchen mit den intakten Bakterien werden beim Rohextrakt pro Mol 1-Nikotin nur noch 2,5 Mol O_2 verbraucht. Da unter diesen Bedingungen kein CO_2 gebildet wird, bleibt die Oxydation offensichtlich bei einem Zwischenprodukt stehen (Abb. 3, S. 7).

Man konnte daher erwarten, dass sich Zwischenprodukte des Nikotinabbaus in der Lösung anhäufen.

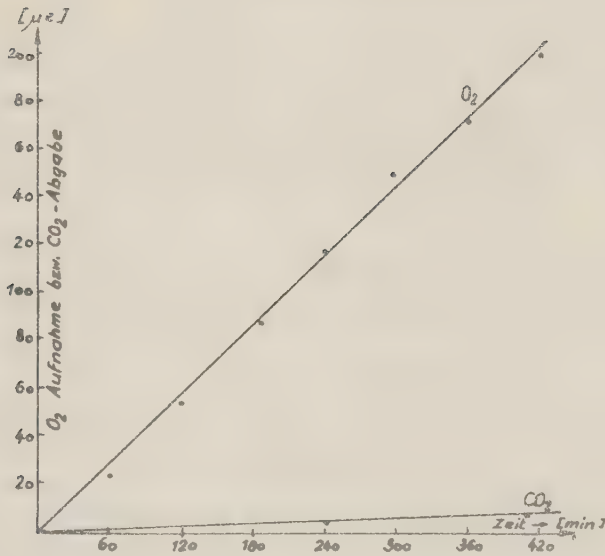


Abb. 3 O₂-Aufnahme und CO₂-Abgabe bei der Nikotinoxydation mit zellfreiem Extrakt.

Zuss.: Hauptraum: 0.5 ml Bakterienextrakt (3.5 mg Protein)
 150 μM Phosphatpuffer pH 6.3
 1.0 μM Methylenblau

Seitenarm: 0.85 μM 1-Nikotin
 75 μM Phosphatpuffer pH 6.3

Zentralgefäß: 0.15 ml 4m KOH. Ges. Vol. = 2.2 ml. T = 30°C.

Wie Tabelle 1 zeigt, ist unter unseren Bedingungen die Sauerstoffaufnahme proportional der Nikotinkonzentration in der Lösung.

Tabelle 1

O ₂ -Aufnahme ($\mu\text{l O}_2$ / 100 Min.)	Nikotinkonzentration (μM / ml)
2.8	0.038
32	0.38
53	0.77

Zuss.: Hauptraum: 0.5 ml Bakterienextrakt (3.5 mg Protein)
 150 μM Phosphatpuffer pH 6.3
 1 μM Methylenblau

Seitenarm: Nikotin wie angegeben

Zentralgefäß: 0.15 ml 4m KOH. Ges.Vol. = 2.2 ml T = 30°C.

b. Kolorimetrische Versuche

Die manometrischen Versuche mit dem zellfreien Extrakt haben gezeigt, dass die für die Nikotinoxidation verantwortlichen Enzyme zum mindesten teilweise extrahierbar sind und bei Verwendung einer katalytischen Menge eines autoxydablen Redoxfarbstoffs Nikotin mit Sauerstoff oxydieren können. Es lag nahe, eine stöchiometrische Menge eines Redoxfarbstoffs zu benutzen, um den Verlauf der Nikotinoxidation bequemer und rascher durch die Reduktion (Entfärbung) des Farbstoffs kolorimetrisch zu verfolgen.

Zu den ersten Versuchen wurde Methylenblau als Redoxfarbstoff benutzt. Da Methylenblau autoxydabel ist, musste anaerob gearbeitet werden. Hierzu wurde mit der von WARBURG und CHRISTIAN (19) beschriebenen Kuvette gearbeitet. Die Reduktion des Methylenblau zu Leukomethylenblau durch Nikotin wurde durch die

Tabelle 2

mg Protein Rohextrakt	- ΔE_{comp} Min.
0.51	0.330
1.02	0.614

Zuss.: 1 μM Methylenblau; 250 μM Phosphatpuffer pH 6.5;
 Enzym wie angegeben. Start der Reaktion durch Zugabe von
 4.25 μM l-Nikotin. Ges.Vol. = 2.1 ml T = 20°C.

Abnahme der Absorptionsmaximum des Redoxfarbstoffs bei 660 m μ im Spektralphotometer direkt gemessen. In der Tab. 2 ist ein Versuch wiedergegeben, der die Abhängigkeit dieser Reaktion von der zugesetzten Enzymmenge zeigt.

3. Optischer Test für die Nikotinoxydation

a. Die kolorimetrische Reaktion

Der optische Test mit Methylenblau als Redoxfarbstoff war für Routinebestimmungen, etwa zur Anreicherung des Nikotinoxydase-Systems zu unbequem, da streng anaerob gearbeitet werden muss. Als weitere gefärbte Oxydationsmittel wurden daher Kaliumhexacyanoferrat(III), Triphenyltetrazoliumchlorid und 2.6-Dichlorphenolindophenol geprüft. Das nicht autoxydable 2.6-Dichlorphenolindophenol erwies sich als der geeignetste Redoxfarbstoff.

Gibt man zu einer Lösung, die neben Puffer und Enzym blaufärbtes 2.6-Dichlorphenolindophenol enthält, Nikotin, so nimmt die Farbe wegen der Reduktion des Farbstoffs zu seiner Leucoform rasch ab. Die Abnahme der Extinktion kann bequem im Photometer "Eppendorf" bei $\lambda = 578 \text{ m}\mu$ verfolgt werden. Das Absorptionsmaximum des 2.6-Dichlorphenolindophenol bei pH 6.5 liegt nicht weit davon entfernt bei 590 m μ . Für diese Versuche kann eine offene Glasküvette benutzt werden.

b. Substratabhängigkeit

Wie Abb. 4 (s. S. 10) zeigt, ist die Geschwindigkeit der Nikotinoxydation gemessen durch die Reduktionsgeschwindigkeit des Farbstoffs unter den angegebenen Bedingungen von der Farbstoffkonzentration abhängig.

Wegen des grossen Extinktionskoeffizienten des 2.6-Dichlorphenolindophenols ($\epsilon_{578} = 15.6 \cdot 10^6 \text{ [cm}^2/\text{Mol}]$) konnte die Konzentration des Farbstoffs aber nicht bis zur Sättigungskonzentration erhöht werden.

Bei der im Standarttest verwendeten Farbstoffkonzentration von 0.1 $\mu\text{M/ml}$ (Endvolumen 2.0 ml) war die Reaktionsgeschwindigkeit von der Nikotinkonzentration im Bereich von 0.25-1.0 $\mu\text{M/ml}$ unabhängig.

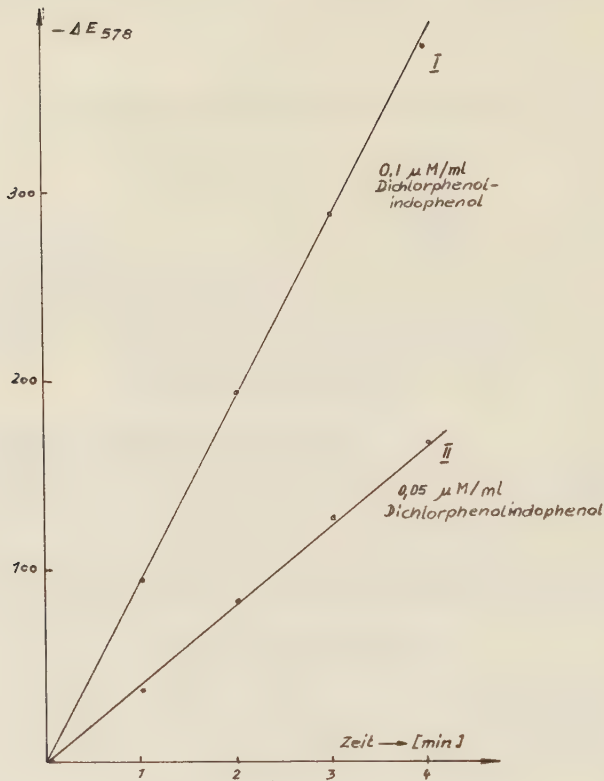


Abb. 4 Abhängigkeit der Nikotinoxydation von der
Dichlorphenolindophenol-Konzentration

Zuss.: 250 μM Phosphatpuffer pH 6.5, 1 mg Enzym, Dichlorphenolindophenol wie angegeben, Start durch Zugabe von 1 μM l-Nikotin. Ges.Vol. = 2.0 ml

T = 20°C

c. Enzymabhängigkeit

Nachdem die für den Test optimalen Konzentrationen der Reaktionsteilnehmer festgelegt waren, wurde die Abhängigkeit von der Enzymmenge geprüft (Abb. 5).

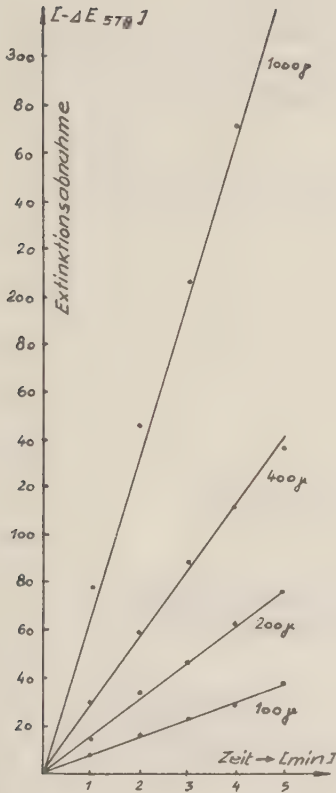


Abb. 5 Abhängigkeit der Nikotinoxydation von der Enzymkonzentration.

Zuss.:

250 μ M Phosphatpuffer pH 6.5

0.2 μ M Dichlorphenolindophenol, 1% Enzym
wie angegeben; Start mit 2.5 μ M 1-Nikotin.

Ges.Vol. = 2.0 ml

T = 20°C

Abb. 5 zeigt, dass die Reduktion des 2,6-Dichlorphenolindophenols in den ersten 5 Minuten im Bereich von 0 bis 0.5 mg Protein/ml des Rohextrakts linear mit der Zeit läuft.

Die Reduktionsgeschwindigkeit ist proportional der Enzymkonzentration (Abb. 6).

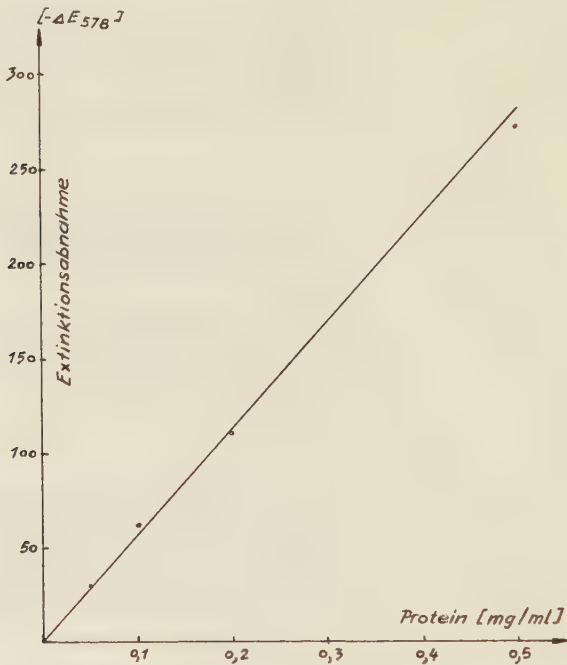


Abb. 6 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration. Bedingungen wie in Abb. 5 angegeben.

Dieser einfache Test wird für alle weiteren Enzymaktivitätsbestimmungen benutzt. Als Einheit der Enzymaktivität definieren wir diejenige Menge Enzym, die unter den Standardbedingungen (vgl. Abb. 5) eine Extinktionsabnahme bei 578 m μ von $\Delta E = 0.001$ pro Minute bewirkt. Die Extinktionsabnahme wird dabei zwischen der 1. und 5. Minute verfolgt.

Wird ein Überschuss an Enzym eingesetzt, so kann dieser Test auch als Mikrobestimmung für Nikotin benutzt werden. Es können noch bequem 0.0025 μ M Nikotin (0.41 γ) im Test erfasst werden.

d. pH-Abhängigkeit

Schliesslich wurde noch die pH-Abhängigkeit der Nikotinoxydation untersucht. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich bei der Änderung des pH nicht nur die Geschwindigkeit der Reaktion, sondern auch der Extinktionskoeffizient des 2.6-Dichlorphenolindophenols ändert. In Abb. 7 (s.S. 14) sind die Absorptionsspektren (cm^2/Mol) des 2.6-Dichlorphenolindophenols zwischen pH 4.5 und pH 8.5 angegeben. Dabei wurde das Spektrum der Farbstofflösung in 0.125m Phosphatpuffer von angegebenem pH gegen den reinen Puffer gemessen. Die Farbstoffkonzentration - es wurde krist. 2.6-Dichlorphenolindophenol p.A. von Merck benutzt - betrug $0.1 \mu\text{M}/\text{ml}$.

Unser Test wurde bei einer Pufferkonzentration von 0.125m bei verschiedenem pH unter sonst gleichen Bedingungen durchgeführt.

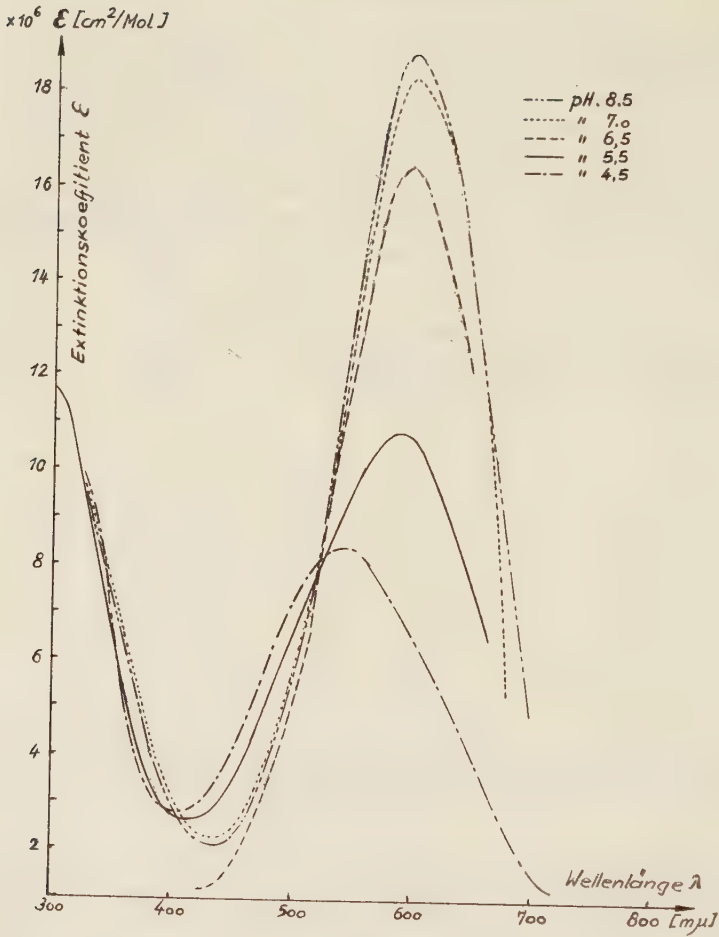


Abb. 7 Die Spektren des Dichlorphenolindophenol zwischen pH 4.5 und 8.5.

In Abb. 8 ist die Abhängigkeit der Farbstoffreduktion in $\mu\text{M}/\text{ml}/\text{Min}$ vom pH der Lösung angegeben.

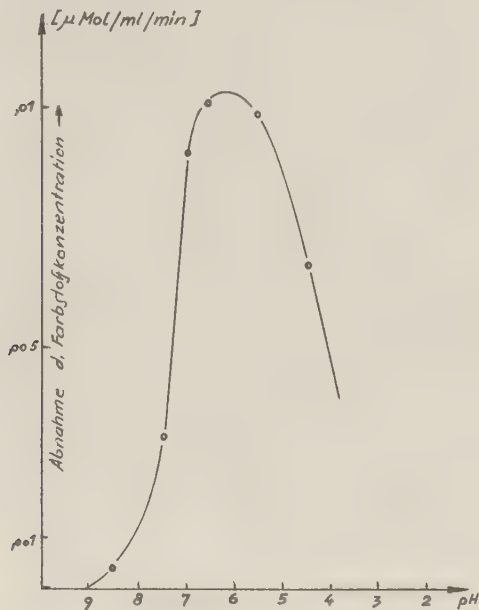


Abb. 8 pH-Abhängigkeit der Nikotinoxydation

Zuss.: 250 μM Phosphatpuffer von angegebenem pH, 0.2 μM Dichlorphenol-indophenol, 0.4 mg Enzym. Start mit 1 μM l-Nikotin.

Ges.Vol. = 2.0 ml, $T = 20^\circ\text{C}$.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist zwischen pH 6.8 und 6.2 optimal.

4. Reinigung des Systems der Nikotinoxydation

Nachdem ein bequemer und rasch auszuführender optischer Test zur Bestimmung der Enzymaktivität zur Verfügung stand, schien es zweckmässig, vor der Suche nach Zwischenprodukten des Nikotinabbaus eine gewisse Fraktionierung des Rohextraks durchzuführen und das für die Nikotinoxydation verantwortliche System etwas anzureichern. Dies war auch aus Gründen der Enzymstabilität ratsam. Der Rohextrakt behält seine Aktivität nur in eingefrorenem Zustand und verliert sie sehr rasch bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren. Bei 0°C aufbewahrt verliert er die Hälfte der Aktivität in 24 Stunden.

a. Aufschluss der Bakterien

Das Aufschliessen der Bakterien durch Zerreiben mit Aluminiumoxyd ist für grössere Enzymansätze unbequem. Die gewaschenen Bakterien wurden vielmehr in verdünntem Phosphatpuffer pH 6.8 suspendiert und in dem von MERKENSCHLAGER, SCHLOSSMANN und KURZ (20) beschriebenen Zellhomogenisator mit Glasperlen unter Kühlung mit flüssigem Kohlendioxyd für ca. 2 Minuten zerschlagen. Der auf das Dreifache verdünnte Extrakt wurde durch Zentrifugieren bei 6 000 g in 10 Minuten von den Glasperlen und gröberen Zelltrümmern befreit und anschliessend 5 Minuten lang bei 22 000 g zentrifugiert. Der so erhaltene dunkelgelbe opaleszierende Rohextrakt enthält 6-8 mg Protein/ml.

b. Fraktionierte Protaminfällung

Der hohe Gehalt des Bakterien-Extrakts an Nukleinsäuren verschlechtert die Wirksamkeit der meisten üblichen Fraktionierungsmethoden. Als erster Schritt wurde daher der Überschuss an Nukleinsäuren mit Protaminsulfat entfernt.

Das Verhältnis der Extinktionen bei $\lambda = 280$ und $260 \text{ m}\mu$ im Rohextrakt betrug 0.59, was nach WARBURG und CHRISTIAN (21) einem Gehalt von 20% Nukleinsäuren entspricht. Der Rohextrakt wird solange mit 0.05proz. Protaminsulfatlösung versetzt, bis das Verhältnis E_{280} / E_{260} im Überstand auf etwa 0.72 gestiegen ist, was einem Nukleinsäuregehalt von ca. 9% entspricht. Der Niederschlag wird verworfen. Der Überstand enthält noch das gesamte Protein und die volle Aktivität. Dann wird weiter 0.05proz. Protaminsulfatlösung zugegeben, bis das Verhältnis E_{280} / E_{260} im Überstand auf etwa 1.0 gestiegen ist. Der Niederschlag enthält die gesamte Aktivität. Aus dem Niederschlag kann das Enzym mit Bicarbonatlösung extrahiert werden. Das pH des dunkelgelb, klar zentrifugierten Extrakts wird auf pH 6.8 gebracht.

c. Geladsorption

Nach der Dialyse gegen 0.005m Phosphatpuffer pH 6.8 wird aus der Enzymlösung, deren Proteinkonzentration ca. 3-4 mg Protein/ml beträgt, mit etwas Calciumphosphatgel, hergestellt nach der Vorschrift von KUNITZ (22), inaktives Protein beseitigt und das pH im Überstand wieder auf 6.8 eingestellt.

d. Fraktionierung mit Ammoniumsulfat

Durch langsame Zugabe von 2mal mit Trilon B umkristallisiertem Ammoniumsulfat wurde die Enzymlösung weiter fraktioniert. Der Hauptteil der Enzymaktivität fiel zwischen 40-70% Ammoniumsulfatsättigung aus. Der Überstand war dann immer frei von Aktivität. Der tiefgelb gefärbte Niederschlag wurde in 0.05m Phosphatpuffer pH 6.8 aufgenommen.

Es resultiert eine tiefgelbe Lösung mit ca. 12 mg Protein/ml.

Die Tabelle 3 zeigt eine Zusammenstellung über den Anreicherungsangang, in

Tabelle 3

Stufe	Volumen (ml)	Gesamt- protein (mg)	Gesamt- aktivität (Einheiten)	Spez. Aktivität (Einh./mg)	Ausbeute
Bakterien- extrakt	92	648	310.000	479	-
Bicarb.-extrakt d. Protaminfällung	15	61.6	280.000	4.550	90
Überstand d. Geladsorption	16	39	260.000	6.700	84
0.4-0.7 (NH ₄) ₂ SO ₄ - Fraktion	6	35	260.000	7.450	84

dessen Verlauf das Nikotinoxidasesystem etwa 16fach angereichert wird. Das angereicherte Enzym war ziemlich stabil und konnte in der Kühltruhe bei -15°C monatelang aufbewahrt werden.

Die Enzymaktivität wurde durch 10⁻⁴ m p-Clormercuribenzoat zu 13%, durch 10⁻³ m p-Clormercuribenzoat zu 81% gehemmt.

5. Stöchiometrie und Kinetik der Nikotinoxydation

a. mit dem Rohextrakt

Die manometrischen Versuche mit intakten Bakterien und mit dem Rohextrakt hatten ergeben, dass pro Mol Nikotin 5.0 bzw. 2.5 Mol Sauerstoff aufgenommen werden. Es war nun von grossem Interesse, entsprechende stöchiometrische Versuche mit dem optischen Test unter Einsatz kleiner Mengen Nikotin mit dem Rohextrakt und dem angereicherten Enzym zu wiederholen.

In einem entsprechend vergrösserten Ansatz mit 16 200 γ Nikotin wurde festgestellt, dass nach dem Ablauf der Reaktion papierchromatographisch kein freies Nikotin mehr nachweisbar ist. Dabei waren die Bedingungen so gewählt worden, dass noch 1% nicht umgesetztes Nikotin leicht hätte nachgewiesen werden können. Das Nikotin ist also tatsächlich völlig umgesetzt worden.

Die Abb. 9 gibt einen Versuch mit dem Rohextrakt wieder.

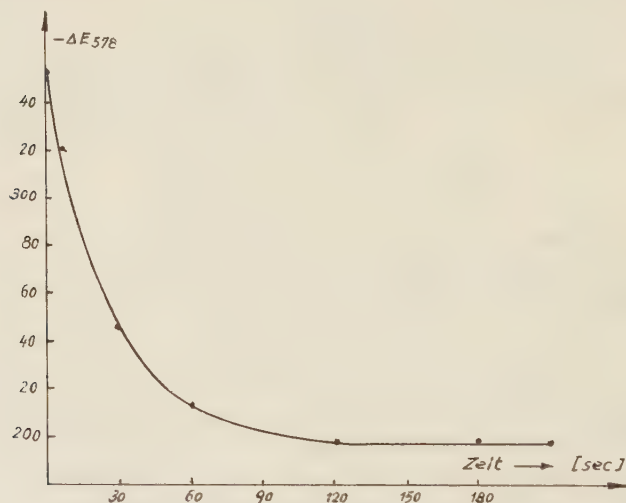


Abb. 9 Kinetik der Nikotinoxydation mit Rohextrakt

Zuss.: 0.2 μ M Dichlorphenolindophenol, 250 μ M Phosphatpuffer pH 7.0,
0.78 mg Enzym; Start mit 0.0085 μ M 1-Nikotin.
Ges.Vol. = 2.0 ml, T = 20°C.

Die Reaktion läuft rasch und ohne erkennbare Zwischenstufen ab. In der folgenden Tabelle 4 sind einige dieser Versuche zusammengefasst.

Tabelle 4

µM Nikotin eingesetzt	µM Dichlorphenolindophenol reduziert	Nikotin
		Dichlorphenolindophenol
0.0042	0.0085	1 : 2
0.0127	0.0234	1 : 2
0.0255	0.0485	1 : 2
0.0340	0.0646	1 : 2

Ansätze wie in Legende zu Abb. 9 beschrieben, aber mit verschiedenen Mengen Nikotin. Zur Auswertung wurde als Extinktionskoeffizient des 2.6-Dichlorphenolindophenols bei pH 7.0 $\epsilon_{578} = 16.7 \cdot 10^6$ [cm²/Mol] (23) benutzt.

Da bei der Dehydrierung organischer Verbindungen in der Zelle gewöhnlich 2 Reduktionsäquivalente übertragen werden, weist das gefundene Verhältnis

1 Mol Nikotin : 2 Mol 2.6-Dichlorphenolindophenol

auf zwei Oxydationsschritte hin.

b. mit dem gereinigten Enzymsystem

Den Beweis dafür erbrachten stöchiometrische Versuche mit dem angereicherten Enzymsystem. Abb. 10 zeigt den zeitlichen Verlauf der Oxydation einer kleinen Menge Nikotin durch 2.6-Dichlorphenolindophenol unter Verwendung des 16fach angereicherten Enzympräparats als Katalysator.

Der Reaktionsverlauf lässt sich in drei Abschnitte zerlegen (I), (II), (III). Zunächst findet eine sehr rasch ablaufende Oxydation (I) statt, die schon nach 15 Sekunden zum Stillstand kommt. Erst nach einer Induktionsperiode (II) von etwa 45 Sekunden geht die Oxydation weiter und kommt nach 4 Minuten zum Stillstand. Dabei wird im ersten und zweiten Oxydationsschritt je 1 Mol 2.6-Dichlorphenolindophenol pro Mol Nikotin verbraucht. Insgesamt wurden bei diesem Versuch, wie bei der Dehydrierung mit rohem Bakterienextrakt pro Mol Nikotin 2 Mol Farbstoff reduziert. Dies zeigt die folgende Tabelle 5. (Siehe S. 21)

Die Kinetik und die Stöchiometrie der Reaktion mit dem angereicherten Enzymsystem deuten folgendes an: Von dem Enzymsystem werden mindestens drei Teilschritte bei der Oxydation des Nikotin mit 2.6-Dichlorphenolindophenol katalysiert, nämlich erst ein oxydativer Angriff des Nikotins, für den die Bruttogleichung gilt:

(1) Nikotin + Dichlorphen. $\longrightarrow$ Leucodichlorphen. + Produkt A

weiter eine nicht oxydative, da keinen Redoxfarbstoff verbrauchende Umwandlung, summarisch angedeutet durch die Gleichung

(2) Produkt A $\longrightarrow$ Produkt B

und schliesslich die Oxydation des Produkts B zum Produkt C nach der Gleichung

(3) Produkt B + Dichlorphen. $\longrightarrow$ Leucodichlorphen. + Produkt C

Auf die Reaktion (2) weist die deutliche Induktionsperiode zwischen dem 1. und 2. Oxydationsschritt hin.

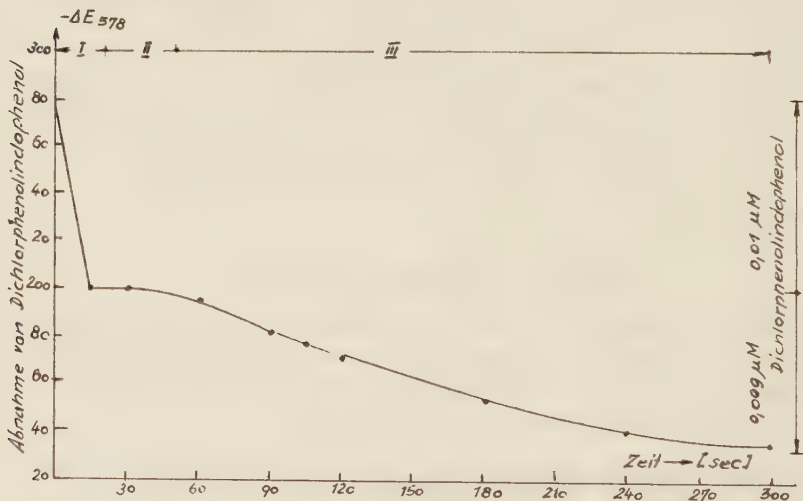


Abb. 10 Kinetik der Nikotinoxidation mit gereinigtem Enzym

Zuss.: 250 μ M Phosphatpuffer pH 6.5, 0.2 μ M Dichlorphenolindophenol, 105 μ g 16fach ger. Enzym. Start mit 0,01 μ M 1-Nikotin.
Ges. Vol. = 2.0 ml, T = 20°C.

Das zur Deutung der Stöchiometrie und Kinetik vorgeschlagene Schema diene als Arbeitshypothese für die folgenden Arbeiten über die Zwischenprodukte des biologischen Nikotinabbaus

Tabelle 5

Nikotin eingesetzt μM	Verbrauch an Dichlorphenolindophenol während des 1. Oxydat.-Schrittes	Verbrauch an Dichlorphenolindophenol während des 2. Oxydat.-Schrittes	insgesamt Nikotin
			Dichlorphenolindophenol
0.01	0.010 μM	0.009 μM	1 : 2
0.02	0.022 μM	0.021 μM	1 : 2
0.03	0.03 μM	0.029 μM	1 : 2

Zuss.: wie in der Legende zu Abb. 10, aber mit verschiedenen Mengen Nikotin.

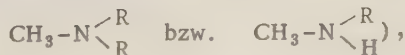
II. Zwischenprodukte des biologischen Nikotinabbaus

1. Die Entdeckung der Zwischenprodukte

Die Kinetik der Nikotinoxidation mit dem angereicherten Enzym hatte wahrscheinlich gemacht, dass bei dem Nikotinabbau einige Zwischenprodukte auftreten. Es lag nahe zu deren Nachweis die empfindliche papierchromatische Methode heranzuziehen.

Benutzt wurde eine Modifikation des von JATZKEWITZ (24) angegebenen Verfahrens der aufsteigenden Papierchromatographie. Als Lösungsmittel wurde Butanol-Eisessig-Wasser (10 : 1 : 3) und mit 0.2m Natriumacetat besprühtes Whatman-I-Papier genommen. Ein aliquoter Teil des Reaktionsgemisches, bestehend aus 250 μM Phosphatpuffer pH 6.5 0.2 μM Dichlorphenolindophenol, 0.2 mg Enzym und 1 μM 1-Nikotin (Endvol. 2.0 ml) wurde nach Beendigung der Reaktion auf das Papier aufgetragen und über Nacht (22 Stunden) in dem angegebenen Lösungsmittel laufen gelassen.

Entwickelt man das Chromatogramm durch Besprühen mit Kaliumtetraiodobismutat (Dragendorfs Reagens auf Alkaloide, spezifisch für die Gruppierung



so ist kein Nikotin mehr nachweisbar (R_f -Wert = 0.8). Statt dessen beobachtet man zwei neue orange angefärbte Flecke mit einem R_f -Wert von 0.1 bzw. 0.33. Nicht umgesetztes 2.6-Dichlorphenolindophenol und seine Leucoverbindung werden durch Kaliumtetraiodobismutat nicht angefärbt. Sie wandern in unserem Chromatogramm mit den R_f -Werten 1.0 (Dichlorphenolindophenol) bzw. 0 (Leucofarbstoff).

Die beiden Reaktionsprodukte werden bequemer und empfindlicher als mit Dragendorfs Reagens direkt im UV-Licht nachgewiesen. Im UV-Licht mit einem

Schwerpunkt der Emission bei 260 m μ zeigt sich das langsam wandernde Zwischenprodukt durch eine leuchtend hellblaue Fluoreszenz. Das rascher wandernde Produkt erscheint als tief dunkler Fleck bei Bestrahlung mit gefiltertem UV-Licht mit einem Schwerpunkt der Emission bei 340 m μ . x)

Wegen der hohen Salzkonzentration im Reaktionsgemisch ist es schwierig gute Chromatogramme zu erhalten. Daher wurde das Reaktionsgemisch auf folgende Weise aufgearbeitet: Oxydiertes und reduziertes 2,6-Dichlorphenolindophenol wurde aus dem Reaktionsansatz durch halbstündiges Perforieren mit Äther entfernt. Anschliessend wurde gefriergetrocknet und die Reaktionsprodukte mit 96 proz. Äthanol extrahiert. Die konzentrierte, schwach gelb gefärbte, alkoholische Lösung wurde chromatographiert. Das erste Zwischenprodukt wandert mit einem R_f-Wert von 0,32, die andere Verbindung mit dem R_f-Wert 0,51. Beide Substanzen konnten auch in dem von LEISERSON und WALKER (25) angegebenen Lösungsmittel (puffergesättigtes Butanol) nicht weiter aufgetrennt werden.

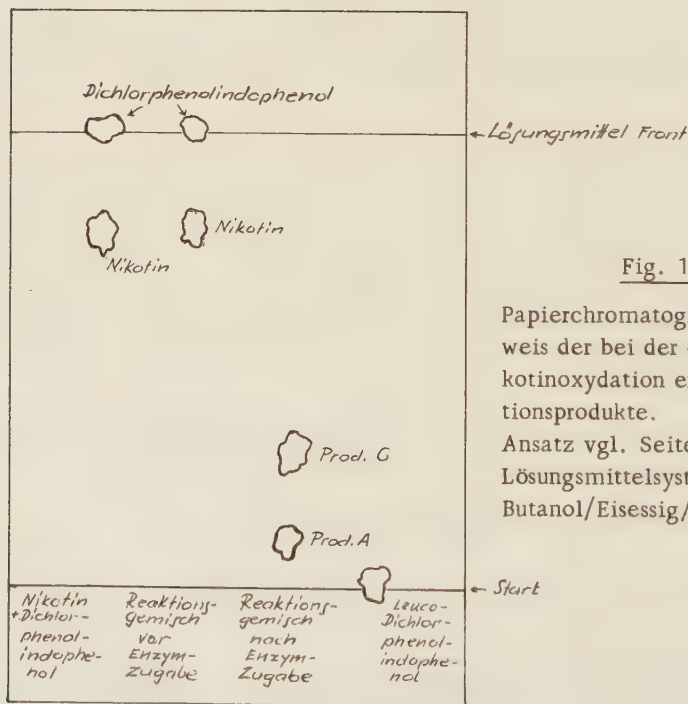


Fig. 1

Papierchromatographischer Nachweis der bei der enzymatischen Nikotinoxidation entstehenden Reaktionsprodukte.

Ansatz vgl. Seite 21.

Lösungsmittelsystem:

Butanol/Eisessig/Wasser.

x) Fluoreszenzfolie (8508) 1 T 6662, Quarzlampen Gesellschaft Hanau a. Main

2. Das Produkt A

a. Isolierung und Kristallisation

Um grössere Mengen des Produktes A ($R_f = 0.32$) zu erhalten, wurde eine grosse Menge Nikotin enzymatisch oxydiert. So wurden zu etwa $100 \mu\text{M}$ 1-Nikotin in Phosphatpuffer mit Enzym $100 \mu\text{M}$ 2,6-Dichlorphenolindophenol zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde dann wie oben beschrieben aufgearbeitet. In ca. 20 Papierchromatogrammen wurden die Reaktionsprodukte getrennt. Die Banden wurden ausgeschnitten, die Substanz vom Papier eluiert und gefriergetrocknet. Aus dem trockenen Rückstand, der neben dem Produkt hauptsächlich Puffer enthielt, wird die unbekannte Verbindung mit 96proz. Äthanol extrahiert. Die alkoholische Lösung wird zur Trockne gebracht und mit wasserfreiem Ligroin bei Siedehitze nochmals extrahiert. Nach dem Einengen kristallisiert das Produkt A in kleinen Tafeln vom Schmelzpunkt $102-103.5^\circ\text{C}$ (Kofler) aus.

b. Eigenschaften

Eine Reihe der Eigenschaften des Produkts A konnten schon auf den Papierchromatogrammen festgestellt werden. So reagiert es mit Kaliumtetraiodobismutat, was ein Hinweis auf eine $>\text{N}-\text{CH}_3$ -Gruppierung im Molekül ist. Die Verbindung ist nicht der oxydativen Desaminierung mit Ninhydrin zugänglich (negative Ninhydrin-Reaktion). Die Reaktion mit Bromcyan nach KÖNIG (26) auf Verbindungen des Pyridins fiel negativ aus. Dies ist aber kein Beweis, dass im Produkt A kein intakter Pyridinring mehr vorliegt, da nach KUFFNER u. FADERL (27) nur Verbindungen des Pyridins mit nicht substituierter α -Stellung zum Stickstoff eine positive Reaktion geben.

Sehr auffällig war die spektrale Veränderung, die bei der Reaktion stattgefunden hatte. In der Abb. 11 (s.S. 24) ist das Spektrum der vom Chromatogramm eluierten Verbindung im Vergleich zum Nikotin aufgetragen.

Man erkennt, dass ein deutlicher Eingriff in das chromophore System des Nikotins, den Pyridinring, stattgefunden haben muss. Die Absorptionsmaxima des Nikotinspektrums bei $\lambda = 210$ und $\lambda = 261 \text{ m}\mu$ sind durch einen bathochromen Effekt nach 231 bzw. 297 $\text{m}\mu$ verschoben worden.

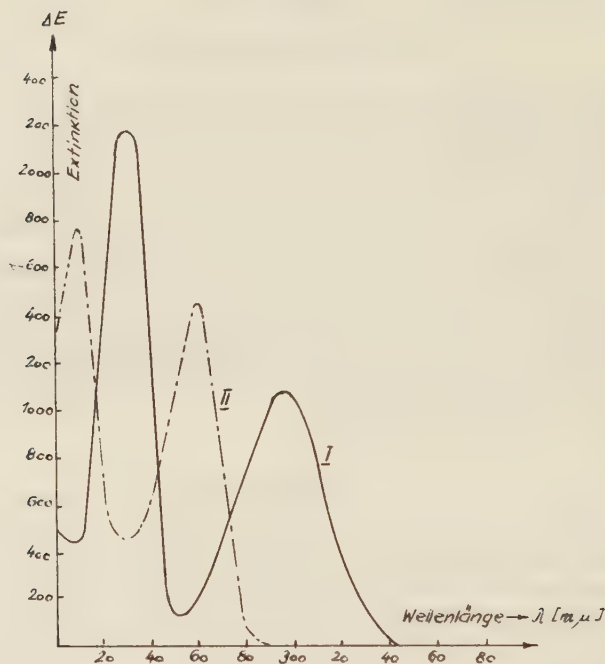


Abb. 11 Spektrum des Nikotins und des Produkts A.

- I. Eluat des durch Papierchromatographie gewonnenen Präparats A, gegen Papireluat ohne Zwischenprodukt A.
- II. 1-Nikotin (0.1 μM) in 2 ml Wasser, gegen reines Wasser.

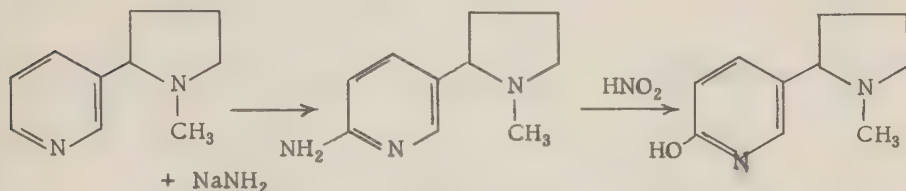
c. Identifizierung

Unter den von FRANKENBURG und VAITEKUNAS (7) gefundenen Zwischenprodukten aus dem Kulturmedium von auf Nikotin wachsenden Bakterien, war auch 6-Hydroxynikotin isoliert worden. Die für diese Verbindung angegebenen Maxima des Absorptionsspektrums waren die gleichen, wie die für unsere Verbindung gefundenen.

Zur Prüfung der Hypothese, ob das Zwischenprodukt vielleicht 6-Hydroxynikotin sei, wurde von mir 6-Hydroxynikotin auf dem von TSCHITSCHIBABIN (28) angegebenen Weg synthetisiert.

Hierbei wird mit Natriumamid in die 2- bzw. 6-Stellung des Nikotins die Ami-

nogruppe eingeführt, wobei eine Razemisierung des Nikotins stattfindet. Das isolierte 6-Aminonikotin wird diazotiert und das Diazoniumsalz zur Hydroxyverbindung verkocht.



Die Substanz kristallisiert aus Ligroin in farblosen Tafeln vom Schmelzpunkt 103.5-104.5°C (Kofler) und ist optisch nicht aktiv (d,l-Form) (28).

Das Produkt A und das synthetisch gewonnene 6-Hydroxynikotin zeigen den gleichen Schmelzpunkt. Der Mischschmelzpunkt mit gleichen Mengen Substanz lag bei 103.5°C. Auch die Spektren der beiden Verbindungen erwiesen sich als identisch wie Abb. 12 (s.S. 26) zeigt.

Der molare Extinktionskoeffizient des 6-Hydroxynikotins beträgt nach Bestimmungen an reinstem, noch papierchromatographisch von Spuren von 6-Aminonikotin befreiten Präparaten mit dem Schmelzpunkt 106.5-107.5°C (Kofler) in 0.1m Kaliumphosphatpuffer pH 7.0

$$\epsilon_{297} = 6.2 \cdot 10^6 \text{ [cm}^2/\text{Mol]}$$

$$\epsilon_{231} = 13 \cdot 10^6 \text{ [cm}^2/\text{Mol]}.$$

Schliesslich zeigte auch noch eine vergleichende Papierchromatographie, dass das Produkt A mit dem 6-Hydroxynikotin in der hellblauen Fluoreszenz im UV-Licht und im R_f -Wert völlig übereinstimmt.

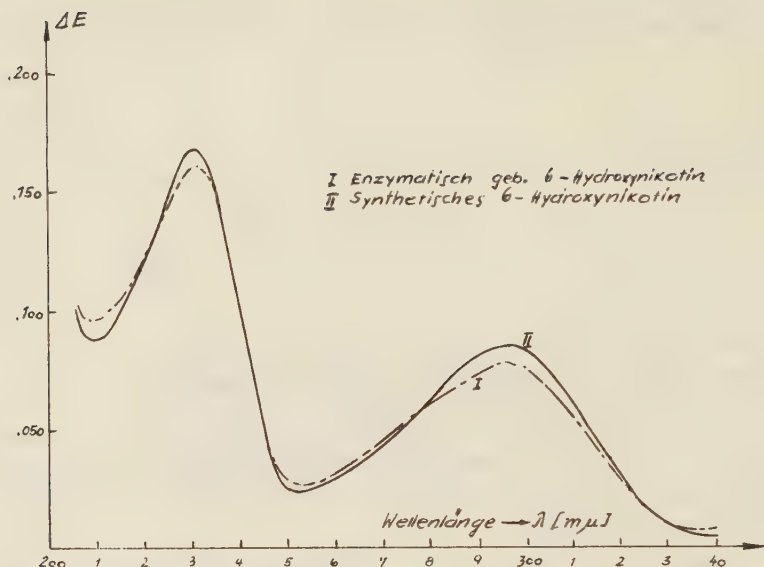
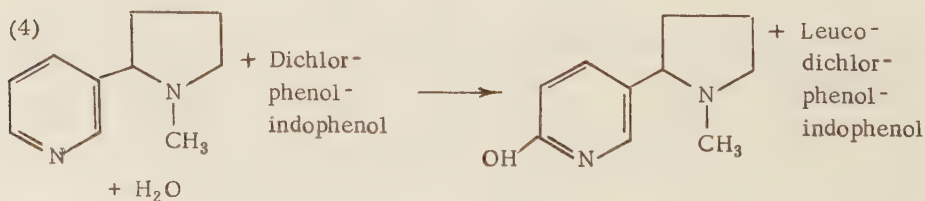


Abb. 12 Absorptionsspektren des synth. und enzymatisch gewonnenen 6-Hydroxynikotins.

- I) 0.1 ml Eluat des durch Papierchromatographie gewonnenen Präparats in m / 15 Phosphatpuffer pH 7.0 gegen 0.1 ml Eluat eines Kontrollchromatogramms ohne Produkt A im gleichen Puffer.
- II) 0.027 μ M synth. d, 1-6-Hydroxynikotins in m / 15 Phosphatpuffer pH 7.0 gegen den gleichen Puffer (d = 1 cm).

d. Stereospezifität der enzymatischen 6-Hydroxynikotin-Bildung

Es war somit geklärt worden, dass der erste enzymatische Angriff auf die Nikotinmolekel in einer Hydroxylierung bestand. Der in der Kinetik mit dem angereicherten Enzymsystem gefundene Oxydationsschritt und seine Stöchiometrie lassen sich damit durch die Gleichung



beschreiben. Verläuft dieser enzymatische Schritt auch stereospezifisch? Bei allen bisherigen Versuchen war immer natürliches l-Nikotin benutzt worden. Nach der Vorschrift von PICTET und ROTSCHEY modifiziert von SPÄTH und BRETSCHNEIDER (29, 30) wurde natürliches l-Nikotin durch 70ständiges Erhitzen im Bombenrohr zu optisch inaktivem d,l-Nikotin razemisiert.

Im optischen Test nach den in Legende zu Abb. 10 angegebenen Bedingungen verbrauchen

0.03 μ M l-Nikotin	0.03 μ M Dichlorphenolindophenol
und 0.03 μ M d,l-Nikotin	0.03 μ M Dichlorphenolindophenol

zur Bildung von l- bzw. d,l-6-Hydroxynikotin. Die enzymatische Hydroxylierung verläuft also nicht stereospezifisch.

e. 6-Hydroxynikotin als Zwischenprodukt des Nikotinabbaus.

6-Hydroxynikotin als Zwischenprodukt im Nikotinabbau sollte auch wie Nikotin dem von mir isolierten *Arthrobakter oxydans* als Substrat dienen können. Wie in einer früheren Arbeit gefunden wurde (1), wandelt der auf Nikotin wachsende *Arthrobakter oxydans* 30% des Nikotins in einen tief violettblauen Farbstoff um.

Für den Wachstumstest wurden Agarplatten mit 0.2% Nikotin, bzw. 0.2% 6-Hydroxynikotin und 0.2% 2-Hydroxynikotin als Substrat hergestellt und mit einer reinen Kultur beimpft.

Innerhalb von 4 Stunden zeigte sich auf der Platte mit 6-Hydroxynikotin als Substrat in der Umgebung der anwachsenden Kulturen die typische tiefblaue Färbung, ebenso wie nach insgesamt 6-7 Stunden auf der Platte mit Nikotin. Auf der Platte mit 2-Hydroxynikotin als Substrat wuchsen die Bakterien auch noch nach Tagen nicht an, noch war irgend eine Blaufärbung zu beobachten.

Damit ist bewiesen, dass 6-Hydroxynikotin wie Nikotin als Substrat des *Arthrobakter oxydans* dienen kann.

3. Das Produkt B

a. Entdeckung

Inkubiert man synthetisch gewonnenes d,l-6-Hydroxynikotin mit Enzym ohne Zusatz eines Redoxfarbstoffs, so findet eine auffällige Verschiebung des Spektrums statt. In Abb. 13 ist das Spektrum vor der Zugabe des Enzyms und nach 25 Minuten wiedergegeben.

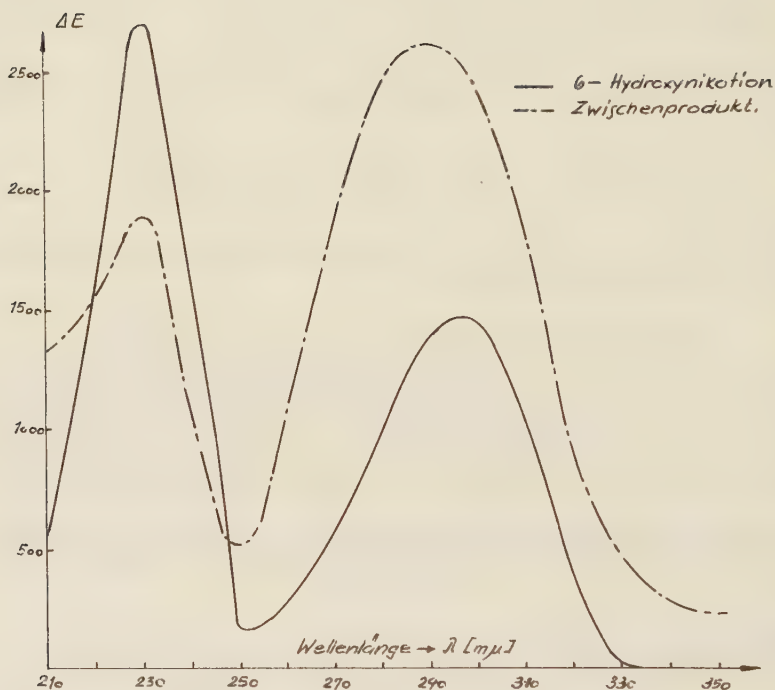


Abb. 13 Spektrum des Produkts B

Zuss.: 0.5 μ M d,1-6-Hydroxynikotin, 250 μ M Phosphatpuffer pH 6,5;
86 $\%$ angereichertes Enzym; gegen Vergleichsküvette 250 μ M Phosphat
pH 6,5; 86 $\%$ anger. Enzym; Vol. = 2.0 ml.

Die Umwandlung des 6-Hydroxynikotins in das Produkt B ist streng enzymabhän-
gig, wie Abb. 14 (s.S. 29) zeigt. Beobachtet wird dabei die Extinktionszunahme/
Min. bei 296 m μ . Entsprechend kann auch die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwin-
digkeit von der 6-Hydroxynikotin-Konzentration gezeigt werden.

Diese Reaktion lässt sich als bequemer optischer Test zur Anreicherung des die
Umwandlung von 6-Hydroxynikotin in das Produkt B bewirkenden Enzyms verwen-
den.

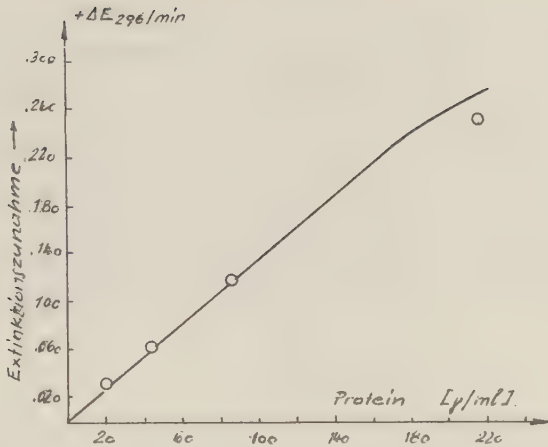


Abb. 14 Enzymabhängigkeit der Bildung des Produkts B.

Zuss.: 250 μM Phosphatpuffer pH 6.5, 0.5 μM d,1-6-Hydroxynikotin, Enzym wie angegeben. Vol. = 2.0 ml. T = 20 C.

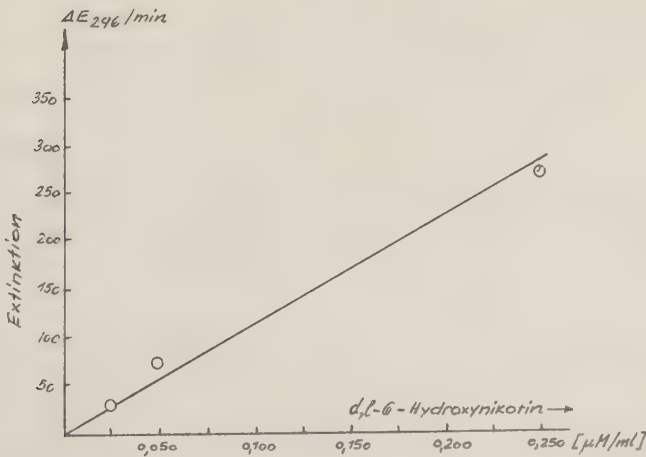


Abb. 15 Substratabhängigkeit der Bildung des Produkts B.

Zuss.: 250 μM Phosphatpuffer PH 6.5, 215 γ angereichertes Enzym, d,1-6-Hydroxynikotin wie angegeben. Ges.Vol. = 2.0 ml, T = 20°C

b. Isolierung

Auch zur Isolierung des Produkts B wurde die Papierchromatographie benutzt.

In einem grösseren Ansatz wurden 15 μM d,l-6-Hydroxynikotin in 500 μM Phosphatpuffer pH 6.5 mit 1.3 mg angereichertem Enzym (Ges.Vol. = 4.0 ml) solange inkubiert bis die Änderung des Spektrums bei 296 $\text{m}\mu$ den Endwert erreicht hatte, was nach etwa 150 Minuten der Fall war. Dann wurde gefriergetrocknet und der trockene Rückstand mit 96proz. Äthanol extrahiert und der, bei der Isolierung des Produkts A angegebenen Papierchromatographie unterworfen. In diesem System wandert das Produkt B direkt unterhalb des 6-Hydroxynikotins (R_f -Wert 0.31) mit dem R_f -Wert 0.28, erkennbar im UV-Licht mit einem Emissionsschwerpunkt bei 260 $\text{m}\mu$ als dunkler Fleck. Der Fleck wurde ausgeschnitten und mit Wasser eluiert.

c. Eigenschaften

In der Abb. 16 ist das Spektrum eines aliquoten Teils des Eluats in Wasser wiedergegeben.

Die Konzentration der Lösung wurde mit Hilfe des weiter unten diskutierten Extinktionskoeffizienten berechnet.

Der Vergleich mit dem Spektrum des 6-Hydroxynikotins zeigt, dass das Maximum bei 231 $\text{m}\mu$ fehlt, das Maximum bei 297 $\text{m}\mu$ nach 285 $\text{m}\mu$ verschoben ist und an Intensität beträchtlich zugenommen hat. Das charakteristische Maximum bei 285 $\text{m}\mu$ bleibt im Bereich von pH 5.4-7.8 fast konstant, verschiebt sich aber im alkalischen Bereich nach längeren Wellenlängen (pH 8.4 325 $\text{m}\mu$, pH 9.9 330 $\text{m}\mu$). Wie die Prüfung auf dem Papierchromatogramm ergab, gibt das Produkt B eine positive Reaktion mit Kaliumtetraiodobismutat, was beweist, dass die $\text{CH}_3\text{-N}^<$ -Gruppierung des Nikotins oder eine $\text{CH}_3\text{-N}^<\text{H}$ -Gruppierung noch vorhanden ist. Die KÖNIG'sche Reaktion mit Bromcyan auf den Pyridinring fällt wie beim Produkt A (6-Hydroxynikotin) negativ aus. Auffälligerweise gibt die Verbindung eine positive Ninhydrinreaktion. Der Fleck färbt sich allerdings rosa, nicht rotviolett an. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass Prolin eine gelbe Farbe mit Ninhydrin gibt (31).

Um etwas über den Ladungszustand der Verbindung zu erfahren, wurde das Verhalten der Substanz bei der Hochspannungs-Papierelektrophorese (1, 32) untersucht. In 0.07M Boratpuffer vom pH 9.0 bei 2500 V Spannung wandert das Produkt B innerhalb von 60 Minuten 0.5 cm weit, 6-Hydroxynikotin unter den gleichen Bedingungen 3.5 cm weit, während sich Aminonikotin 5 cm weit vom Startpunkt entfernt hat. Das Produkt B ist also schwächer basisch bei pH 9.0 als 6-Hydroxynikotin.

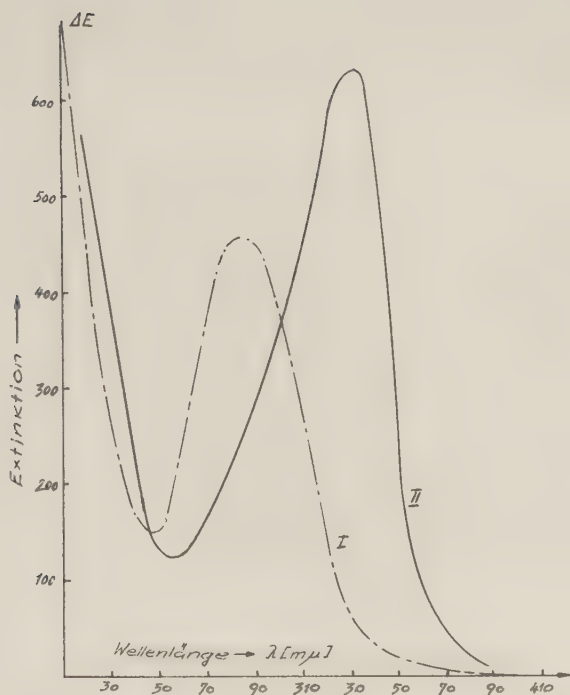


Abb. 16 Spektrum des Produkts B bei verschiedenem pH

Zuss.: I 0.029 μM ml Produkt B in 2.0 ml H_2O gegen reines H_2O .

II die gleiche Lösung nach Alkalisierung mit 0.1n NaOH bei pH 9.9.

d = 1.0 cm, Vol. = 2.0.

d. Prüfung, ob bei der Bildung des Produktes B Ammoniak abgespalten wird.

Zur Konstitutionsermittlung des Produkts B war es von grosser Wichtigkeit zu erfahren, ob noch der gesamte Stickstoff, der im 6-Hydroxynikotin enthalten ist, vorhanden war. Ein einfacher Weg, um etwa gebildetes Ammoniak zu bestimmen, ist die Mikrodiffrusionsmethode nach CONWAY (33). Dazu liess ich die Reaktion in einem verschlossenen Warburggefäss ablaufen und machte das Reaktionsgemisch alkalisch; dabei wird das NH_3 freigesetzt und diffundiert in die vorgelegte Salzsäure. Nach einigen Stunden wird die NH_4 -Konzentration in der Salzsäure mit Neßlers Reagens bestimmt.

Die Methode ist ausserordentlich genau und zuverlässig und gestattete unter den

benutzten Bedingungen noch Bruchteile von μM NH_3 mit einer Genauigkeit von mindestens $\pm 0.05 \mu\text{M}$ NH_3 zu messen. d,1-6-Hydroxynikotin wurde in Phosphatpuffer mit Enzym inkubiert und der gebildete Ammoniak mit gesättigter Kaliumcarbonatlösung ausgetrieben. Nach Abzug des Blindwerts wurden bei den Ansätzen die in der Tabelle 4 wiedergegebenen Resultate erhalten.

Tabelle 4

eingesetzt d,1-6-Hydroxynikotin μM	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ μM	gefunden Ammoniak μM
0.5	-	-
1.0	-	-
2.0	-	-
-	0.2	0.19

Auf dem Reaktionsweg Nikotin $\rightarrow$ 6-Hydroxynikotin $\rightarrow$ Produkt B wird also keines der beiden in Nikotin enthaltenen Stickstoffatome in Form von Ammoniak freigesetzt.

e. Stereospezifität der Reaktion

Die Oxydation des Nikotins zu 6-Hydroxynikotin verläuft nicht stereospezifisch, wie oben gezeigt wurde. Es war nun von grossem Interesse zu erfahren, ob dies auch für den nächsten Reaktionsschritt, die Umwandlung des 6-Hydroxynikotins in das Produkt B, zutrifft.

Zu diesem Zweck wurden $2 \mu\text{M}$ synthetisches d,1-6-Hydroxynikotin in 0.125M Phosphatpuffer pH 6.5 mit 86% angereichertem Enzympräparat inkubiert (Ges.Vol. = 2.0 ml) bis die Reaktion zum Stillstand gekommen war. Anschliessend wurde das Reaktionsgemisch aufgearbeitet. Nach der Gefriertrocknung, Chromatographie und Elution wurden $0.8 \mu\text{M}$ 6-Hydroxynikotin zurückisoliert, was unter Berücksichtigung der im Isolierungsgang aufgetretenen Verluste etwa der Hälfte des eingesetzten Materials entsprach. Das auf diesem Weg gewonnene 6-Hydroxynikotin erwies sich bei erneuter Inkubation mit Enzym als völlig inaktiv. Die Reaktion 6-Hydroxynikotin $\rightarrow$ Produkt B verläuft also stereospezifisch und erfasst nur einen der beiden Antipoden. Leider war die Ausbeute an zurückgewonnenem 6-Hydroxynikotin zu gering, um seinen Drehwert zu bestimmen. Ich kann daher nicht angeben, welche Form enzymatisch aktiv ist.

Da die Hälfte der eingesetzten Substanz umgesetzt worden war, durfte man annehmen, dass das Gleichgewicht der Reaktion bei pH 6.5 völlig auf der Seite des Produkts B liegt. In Übereinstimmung damit konnte bei Inkubation des Produkts B mit Enzym die Rückbildung von 6-Hydroxynikotin spektralphotometrisch nicht nachgewiesen werden.

f. Extinktionskoeffizient des Produkts B

Die Versuche zur Stereospezifität der 2. nichtoxydativen Reaktion haben ergeben, dass die Hälfte des eingesetzten d,1-6-Hydroxynikotins in das Produkt B umgesetzt werden. Damit lässt sich das Spektrum des reinen Produkts B aus den in Abb. 13 wiedergegebenen Spektren errechnen. Man zieht hierzu von dem nach Ablauf der Reaktion gemessenen Spektrum das halbe Ausgangsspektrum ab, d.h., man berücksichtigt, dass am Ende der Reaktion neben dem Produkt B noch die enzymatisch inaktive Hälfte des eingesetzten d,1-6-Hydroxynikotins vorliegt. Das in Abb. 17 wiedergegebene so errechnete Spektrum des Produkts B stimmt im Bereich von 240 m μ bis 360 m μ mit dem Spektrum der papierchromatographisch isolierten Verbindung (Abb. 16) überein (Abweichungen durch Papierverunreinigungen!).

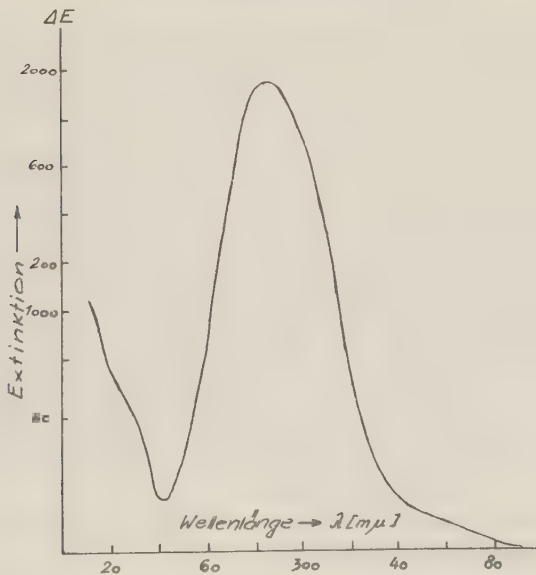


Abb. 17 Errechnetes Spektrum des Produkts B

Nimmt man an, dass 1 Mol der enzymatisch aktiven Form des 6-Hydroxynikotins 1 Mol der 2. Zwischenverbindung liefert, was nach dem Ergebnis der Draggendorfschen Reaktion (in dem Produkt B ist wie in 6-Hydroxynikotin noch die $\text{CH}_3\text{-N}<$ -Gruppierung enthalten) zu schliessen ist, so lässt sich aus der Abb. 17 der molare Extinktionskoeffizient bei 285 m μ des Produkts B in der folgenden Weise errechnen:

Eingesetzt:	0.49 μM	d, l-6-Hydroxynikotin
umgesetzt:	0.246 μM	enzymatisch aktives 6-Hydroxynikotin
gebildet:	0.246 μM	Produkt B

$$\text{Konz. c} = \frac{\mu\text{M}}{\text{cm}^3}$$

$$\frac{\Delta E}{c \cdot a} = \epsilon_{285} [\text{cm}^2/\text{Mol}] \quad \epsilon_{285} = \frac{1.962}{0.123 \cdot 1} \cdot 10^6 = 1.6 \cdot 10^7 [\text{cm}^2/\text{Mol}]$$

4. Das Produkt C

a. Isolierung und Kristallisation

Wie schon auf Seite 22 beschrieben, war bei der Oxydation des Nikotins mit 2,6-Dichlorphenolindophenol neben dem 6-Hydroxynikotin ein weiteres Produkt gefunden worden, das in dem von uns benutzten papierchromatographischen System einen R_f -Wert von 0.51 hatte und auf dem Papier im UV-Licht als dunkler Fleck erkannt wurde. Zur präparativen Gewinnung wurden zu 100 μM l-Nikotin, 4000 μM Phosphatpuffer und 2.3 mg angereichertem Enzym (Endvol. = 30 ml) nach und nach 200 μM 2,6-Dichlorphenolindophenol gegeben, bis der Farbstoff nicht mehr entfärbt wurde. Nach Beendigung der Reaktion wurde das Gemisch mit Äther perforiert und die wässrige Schicht gefriergetrocknet. Aus dem trockenen Rückstand wurde das Produkt C mit Äthanol extrahiert und durch präparative Papierchromatographie von noch vorhandenen kleinen Mengen der anderen Zwischenprodukte abgetrennt. Die aus den Papierstreifen eluierte Substanz wurde gefriergetrocknet, mit Äthanol extrahiert und zur Entfernung des Puffers nochmals chromatographisch gereinigt. Nach der Gefrier Trocknung liess sich die Verbindung aus 96proz. Äthanol in farblosen Nadeln (Abb. 18) kristallisiert erhalten.

Die kristallisierte Verbindung, die den Schmelzpunkt von 256-257°C (Kofler) besitzt, färbt sich an der Luft leicht rosa.

Der Elementaranalyse nach kommt ihr die Formel $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2\text{N}_2$ zu.

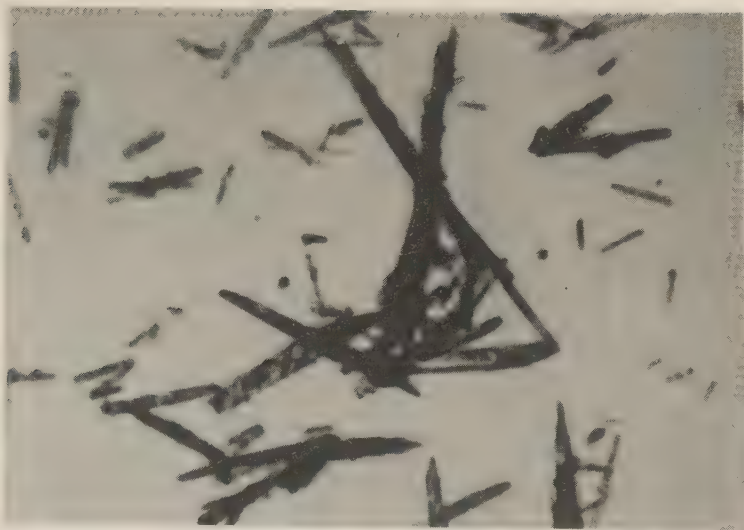


Abb. 18 Kristalle des Produkts C
(etwa 50fach vergrößert)

b. Eigenschaften

α. Spektrale Eigenschaften

In Abb. 19 (s.S. 36) ist das Spektrum der 3mal umkristallisierten Verbindung in Wasser und 0.1n NaOH wiedergegeben.

Die charakteristische Absorptionsbande des Produkts C ist fast völlig verschwunden; dafür tritt eine neue ausserordentlich intensive Bande bei 358 mμ auf. Es hat also erneut ein starker Eingriff in das chromophore System stattgefunden.

Bei der Bestimmung des spezifischen Extinktionskoeffizienten der Verbindung bei 358 mμ ergab eine Konzentration von 10 γ der Substanz/ml in einer 1-cm-Kuvette eine Absorption von $\Delta E = 1.495$, also

$$\epsilon_{\text{spez}358} = 0.15 \text{ [cm}^2/\gamma\text{]}$$

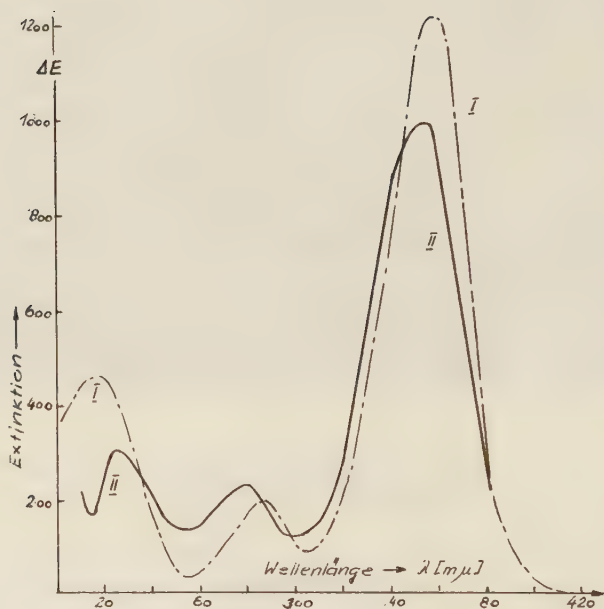


Abb. 19 Absorptionsspektrum des Produkts C

Zuss.: I. 8.9 γ/ml dest. Wasser, d = 1 cm, Vol. = 2.0 ml
 II. 8.9 γ/ml 0.1n NaOH, d = 1 cm, Vol. = 2.0 ml

β. Chemische Eigenschaften

Das Produkt C gibt eine tiefviolette Eisenchloridreaktion. Die Probe auf die Gruppierung $\text{CH}_3\text{-N}<$ oder $\text{CH}_3\text{-N}<_{\text{H}}$ mit Draggendorfs Reagens fällt positiv aus.

KÖNIGs Bromcyan-Reaktion verläuft auch beim Produkt C negativ.

Zur Reduktion des Produkts C werden zu 30 γ der kristallisierten Verbindung in 2.0 ml Wasser 5 mg Kaliumboranat gegeben. Die charakteristische intensive Bande bei 358 mμ verschiebt sich nach 325 mμ unter starker Abnahme der Intensität (vgl. Abb. 20, S. 37).

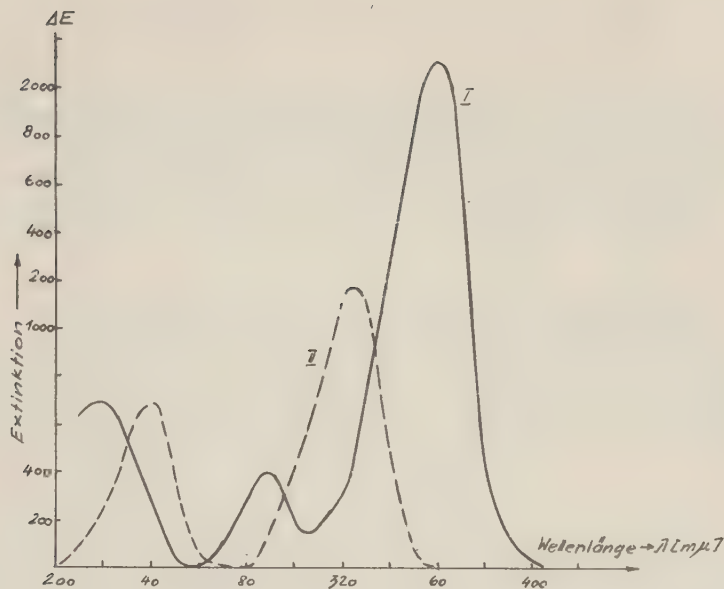


Abb. 20 Veränderung des Spektrums des Produkts C durch Reduktion mit Kaliumboranat

- Zuss.: I. 30% Produkt C in 2.0 ml H₂O gegen reines H₂O
 II. der gleiche Ansatz nach Zugabe von 5 mg KBH₄ in jede Küvette.

Da KBH₄ nach HÖRMANN (34) die $>C=O$ - und $-CHO$ -Gruppe selektiv reduziert, während Säuren, Nitrile, Ester und Alkohole nicht angegriffen werden, scheint eine Carbonyl-Gruppierung im Molekül vorhanden zu sein, wofür auch die positive FeCl₃-Reaktion spricht. Lässt man die saure reduzierte Lösung einige Tage an der Luft stehen, so färbt sie sich blau. Das Spektrum (vgl. Abb. 21, S. 38) stimmt mit dem des blauen Farbstoffs überein, der von intakten Zellen des Arthrobacter oxydans aus Nikotin gebildet wird (vgl. (1)).

Aus dem spez. Extinktionskoeffizienten

$$\epsilon_{\text{spez } 340} = 15.5 \text{ [cm}^2/\text{mg]}$$

des blauen Farbstoffs kann man errechnen, dass sich aus den 30% des Produkts C 14.3% des blauen Farbstoffs gebildet haben müssen. Ob sich der blaue Farbstoff in den Bakterien auch aus einer reduzierten Vorstufe des Produkts C durch enzymatische Oxydation bildet, ist unbekannt.

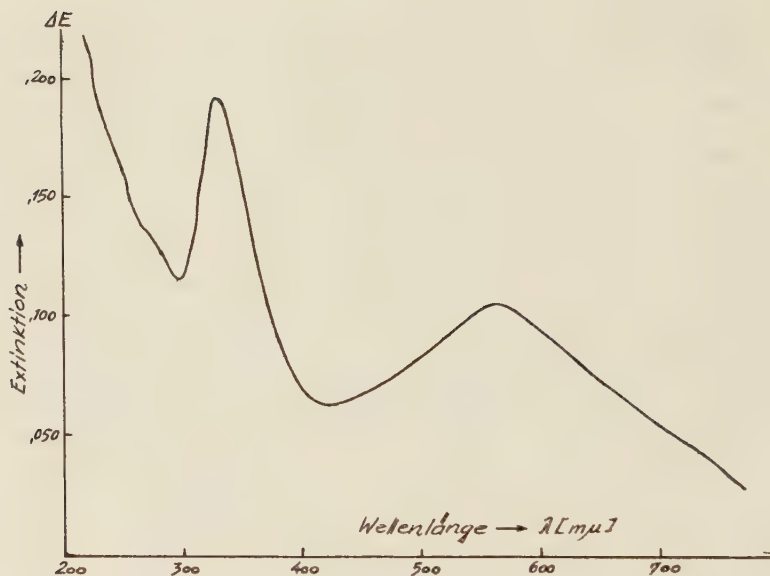


Abb. 21 Bildung des blauen Farbstoffs aus chemisch reduziertem Produkt C

Zuss.: 30 γ Produkt C + 5 mg KBH_4 + 400 μM HCl (Endvol. = 2.2 ml) nach 4 Tagen Stehen an der Luft.

c. Prüfung, ob bei der Bildung des Produkts C Ammoniak abgespalten wird

Schon die Elementaranalyse des Produkts C spricht dagegen, dass auf dem Reaktionsweg von Nikotin zum Produkt C Stickstoff abgespalten wird. Das C(%):N(%) - Verhältnis bleibt nämlich das gleiche 4.2 : 1. Dennoch wurde experimentell nach der Methode von CONWAY (33) geprüft, ob bei der Reaktion Nikotin $\rightarrow$ Produkt C Ammoniak abgespalten wird.

Unter den auf Seite 31 beschriebenen Bedingungen wurde aber bei Einsatz von 1.0 bzw. 2.0 μM Nikotin keinerlei Ammoniakabspaltung gefunden.

11. Zur Reaktionsfolge der Teilschritte im Nikotinabbau

Die auf Seite 20 wiedergegebene Kinetik der Nikotinoxydation mit dem angereicherten Enzym hatte auf mindestens 3 Reaktionsschritte hingedeutet. Ausgehend von dieser Beobachtung konnten papierchromatographisch 3 Verbindungen isoliert werden, von denen sich eine als 6-Hydroxynikotin erwies. Weitere Untersuchungen galten nun der Frage, in welchem Verhältnis die 3 gefundenen Zwischenprodukte zueinander stehen.

1. 6-Hydroxynikotin als Zwischenprodukt der Nikotinoxydation

Sollte 6-Hydroxynikotin, das aus Nikotin durch enzymatische Oxydation mit 2,6-Dichlorphenolindophenol gebildet wird, ein Zwischenprodukt in unserer Reaktionsfolge sein, so muss daraus das gleiche Endprodukt wie aus Nikotin entstehen und die Kinetik der Reaktion muss die gleiche sein.

Die nächsten Versuche beweisen die Überlegungen.

Man sieht, dass im 1. Versuch in einer sehr raschen Reaktion zunächst $0.01 \mu\text{M}$ Dichlorphenolindophenol verbraucht werden (Bildung von $0.01 \mu\text{M}$ enzymatisch aktiven 6-Hydroxynikotin) und dann die Reaktion viel langsamer weiter läuft und nach einem Verbrauch von $0.01 \mu\text{M}$ 2,6-Dichlorphenolindophenol zum Stillstand kommt. Im zweiten Versuch (Kurve II) fehlt die anfänglich rasche Reaktion; das 6-Hydroxynikotin reagiert in der gleichen charakteristischen Kinetik wie in Versuch I unter Verbrauch von $0.01 \mu\text{M}$ 2,6-Dichlorphenolindophenol ab, worauf die Reaktion zum Stillstand kommt.

Unterwirft man die beiden Reaktionsansätze am Versuchsende der Papierchromatographie, so zeigt sich im Chromatogramm des Ansatzes mit 1-Nikotin nur das Produkt C, im Ansatz mit d,l-6-Hydroxynikotin neben dem Produkt C noch ein Flecken, der von dem enzymatisch inaktiven Antipoden des synthetischen 6-Hydroxynikotins herrührt.

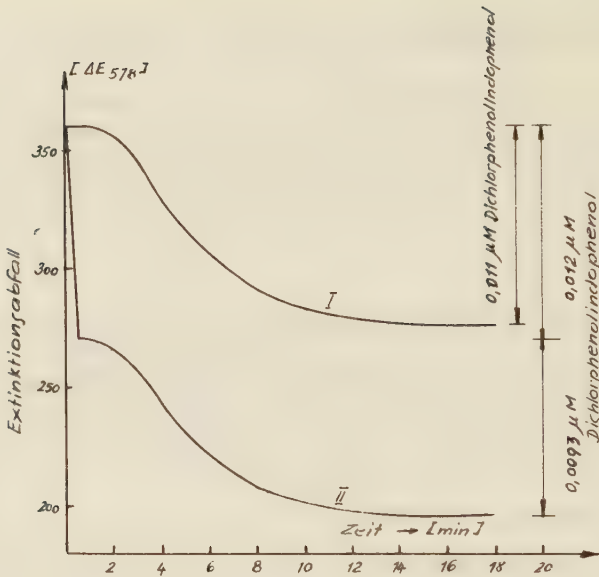


Abb. 22 Kinetik der Nikotin- und 6-Hydroxynikotin-Oxydation

Zuss.: Kurve I 0,2 μM Dichlorphenolindophenol, 250 μM Phosphatpuffer pH 6,5 und 86 γ angereichertes Enzym, 0,01 μM Nikotin.

Kurve II Farbstoff, Enzym, Puffer wie bei I, aber 0,02 μM d,1-6-Hydroxynikotin (entsprechend 0,01 μM enzymatisch aktiver Form)
Ges.Vol. = 2,0 ml, T = 20°C.

2. Die Verbindung B als Zwischenprodukt der Nikotin-Oxydation

Der nächste Versuch liefert den Beweis (Abb. 23), dass das Produkt B in der Reaktionsfolge zwischen 6-Hydroxynikotin und dem Produkt C liegt. Wird der übliche optische Test mit 6-Hydroxynikotin als Substrat sofort nach Enzymzugabe mit 2,6-Dichlorphenolindophenol gestartet, so beobachtet man eine langsame Reduktion des Farbstoffs, die allmählich schneller wird (Kurve I in Abb. 23 (s.S. 41)). Inkubiert man dagegen das 6-Hydroxynikotin mit dem Enzym 30 Minuten vor, bis die spektralphotometrisch zu verfolgende Bildung des Produkts B abgelaufen ist und gibt dann 2,6-Dichlorphenolindophenol zu, so wird der Farbstoff von Anfang an sehr rasch reduziert, obwohl nur die halbe Substratmenge des ersten Versuchs eingesetzt worden war.

Bei Verwendung des Produkts B als Substrat besitzt man damit einen bequemen optischen Test, zur Bestimmung des Enzyms, das den 2. Oxydationsschritt katalysiert.

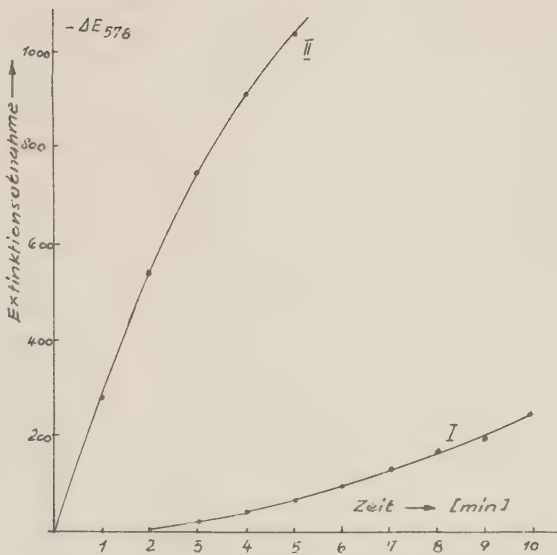


Abb. 23 Kinetik der 6-Hydroxynikotinoxidation

Zuss.: Kurve I: 0.2 μM Dichlorphenolindophenol, 250 μM Phosphatpuffer pH 6,5
1.0 μM 6-Hydroxynikotin, 40 % angereichertes Enzym;
Vol. = 2.0.

Kurve II: 0.5 μM 6-Hydroxynikotin, 250 μM Phosphatpuffer pH 6.5,
40 % gereinigtes Enzym. Nachdem das Produkt B gebildet war,
Zugabe von 0.2 μM Dichlorphenolindophenol.

3. Die Oxydation des Produkts B mit Sauerstoff

Das zweite Zwischenprodukt wird bereits in einer langsamen enzymatischen Reaktion durch den Luftsauerstoff in das Produkt C übergeführt. In einer Versuchsreihe wurde papierchromatographisch gereinigtes Produkt B aerob und anaerob mit Enzym und aerob ohne Enzym inkubiert. Wie sich bei den spektralphotometrischen Messungen herausstellte, ging nur in dem aeroben Versuch mit Enzym das Spektrum des Produkts B in das des Produkts C (Abb. 24 (s.S. 42) über.

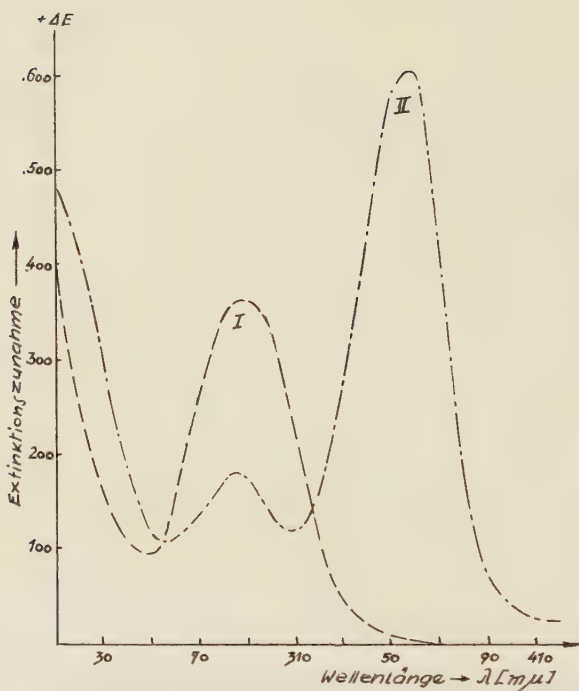


Abb. 24 Enzymatische Oxydation des Produkts B (I) zu Produkt C (II)
durch Sauerstoff

Zuss.: 0.045 μ M Produkt B, 100 μ M Phosphatpuffer pH 6.5. Vol. = 1.0 ml.
 Nach Zusatz von 43 γ angereichertem Enzym bilden sich in 12 Stunden
 8.05 γ des Produkts C.

In den Abbildungen 25a und 25b sieht man in einem analogen Versuch die zeitliche Abhängigkeit der Oxydation des Produkts B zum Produkt C. Die Reaktion verläuft sehr langsam.

In Abb. 25a (s.S. 43) ist die zeitliche Abhängigkeit für die Veränderung des ganzen Spektrums (in den wesentlichen Wellenlängen) angegeben.

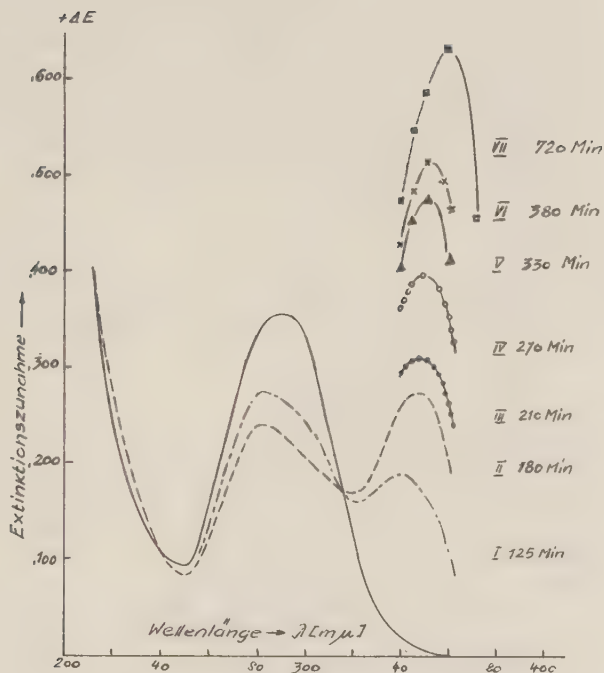


Abb. 25a Veränderung der Spektren bei der enzymatischen Oxydation des Produkts B zum Produkt C durch Luftsauerstoff

Zuss.: 100 μM Phosphatpuffer pH 6.5, 0.045 μM Produkt B, 86 γ gereinigtes Enzym. Ges. Vol. = 1.01 ml.

Das Maximum entsteht durch Verschiebung des verschwindenden Produkts B und des entstehenden Produkts C und verschiebt sich im Lauf der Reaktion bis 358 $\text{m}\mu$.

Abb. 25b (s.S. 44) gibt die Abhängigkeit für eine Wellenlänge (358 $\text{m}\mu$) wieder. Hier ist die Kinetik der Reaktion besser zu erkennen.

Setzt man dagegen Dichlorphenolindophenol zu, so bildet sich das Produkt C in wenigen Minuten (Abb. 25b). Vielleicht ist das Enzym, welches die Oxydation des Produkts B bewirkt, ein gelbes Ferment, welches etwas autoxydabel ist.

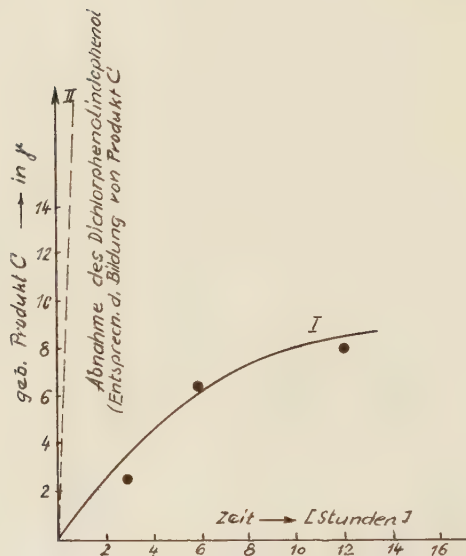


Abb. 25b Kinetik der Oxydation des Produkts B

Zuss.: 100 μ M Phosphatpuffer pH 6,5, 0.045 μ M Produkt B, 86 γ gereinigtes Enzym. Ges.Vol. = 1.01 ml.

Kurve I Oxydationsmittel Luftauerstoff

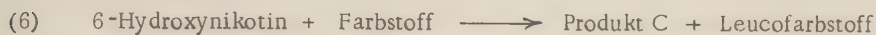
Kurve II Oxydationsmittel 2,6-Dichlorphenolindophenol (0.2 μ M).

4. Die Nikotinoxydase als System mehrerer Enzyme

Schon die Entdeckung mehrerer isolierbarer Zwischenprodukte der Nikotinoxydation hat es sehr wahrscheinlich gemacht, dass die Nikotinoxydasewirkung durch ein Zusammenspiel mehrerer individueller Enzyme zustande kommt. Direkt kann dies dadurch gezeigt werden, dass man die spezifische Aktivität vor und nach der Enzymanreicherung gegen Nikotin und 6-Hydroxynikotin (Produkt A) misst. Hierzu wird ein Standardtest benützt, bei dem man die Geschwindigkeit der Reaktion



bzw. der Reaktion



verfolgt. Die nächste Tabelle gibt die Ergebnisse wieder.

Tabelle 5

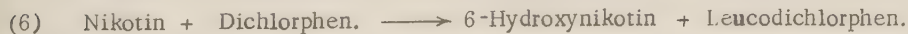
Rohextrakt (Spez. Akt. = Einh./mg Prot.)	gegen Nikotin als Substrat	6-Hydr.- Substr.
	278	127
Bicarbonatextr. d. Protaminf. "	3060	350

Zuss. des Tests: 0.2 μ M Dichlorphenoindophenol, 250 μ M Phosphatpuffer pH 6.5,
1 μ M Substrat, Enzym. Ges. Vol. = 2.0 ml, T = 20°C.
Abnahme der Extinktion bei 578 m μ /min x 1000;
Protein nach der Biuretmethode.

Bei der Enzymanreicherung wird das Ferment, das Nikotin zu 6-Hydroxynikotin oxydiert, 10fach gereinigt, während die beiden nächsten Enzyme nur 3fach angereichert werden. Es ist also möglich, das Nikotinoxydasesystem durch Fraktionierung in die einzelnen Enzyme aufzutrennen.

5. Zur Stereospezifität der Nikotinoxydation

Wie auf Seite 26 gezeigt, verläuft die Reaktion:



nicht stereospezifisch, wohl aber die Reaktion



Dies müsste in der Stöchiometrie der Gesamtreaktion sehr deutlich zum Ausdruck kommen, je nachdem, ob man l-Nikotin oder d,l-Nikotin einsetzt. In der Abb. 26 sind solche Versuche wiedergegeben.

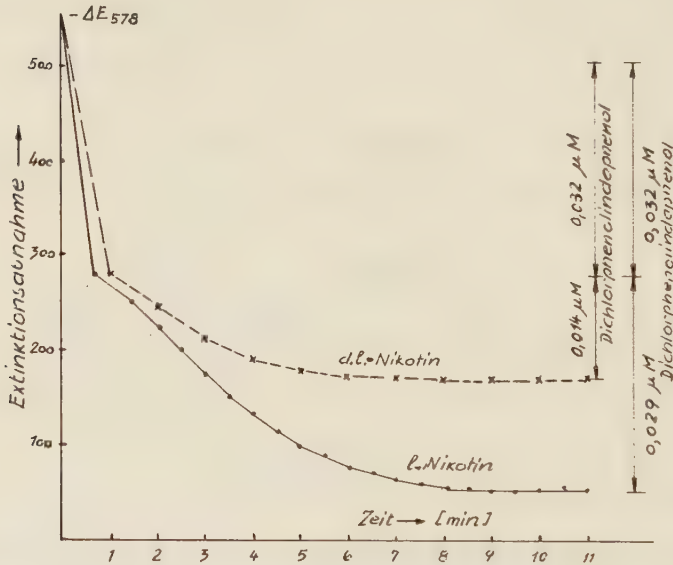


Abb. 26 Kinetik und Stöchiometrie der l-, und d,l-Nikotinoxidation

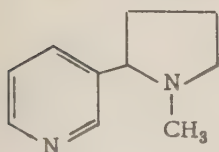
Zuss.: 250 μ M Phosphatpuffer pH 6.5, 0.2 μ M Dichlorphenolindophenol;
 100 γ Enzym; Start mit 0.03 μ M l-Nikotin (o-o-o) bzw. 0.03 μ M d,l-Niko-
 tin (x-x-x-x). Ges.Vol. = 2.0 ml, T = 20°C.

Wie erwartet werden bei d,l-Nikotin bis zum Stillstand der Reaktion insgesamt 0.046 μ M 2,6-Dichlorphenolindophenol reduziert (Verbrauch 1.5 Mol Dichlorphenolindophenol/Mol Nikotin), während mit l-Nikotin 0.061 μ M 2,6 Dichlorphenolindophenol verbraucht werden, d.h. $\frac{1}{3}$ mehr. Dementsprechend liess sich auch nur im ersten Ansatz noch enzymatisch inaktives 6-Hydroxynikotin papierchromatographisch nachweisen und isolieren.

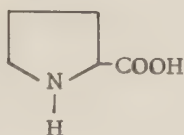
IV. Die Substratspezifität des Systems der Nikotinoxydation

1. Versuche mit intakten Bakterien

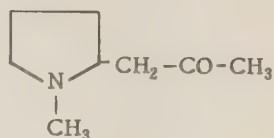
Wie auf Seite 4 gezeigt, veratmet unser *Arthrobakter oxydans* Nikotin sehr rasch. Es war nun von Interesse zu sehen, ob auch die Bauelemente des Nikotins abgebaut würden oder ob nur das intakte Molekül angegriffen wird. Als leicht zugängliche Substanzen wurden daher zum Vergleich mit Nikotin (I) Prolin (II), Hygrin (III), Pyridin (IV) und Nikotinsäure (V) eingesetzt.



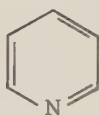
(I)



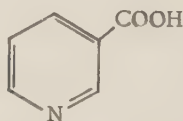
(II)



(III)



(IV)



(V)

Der Verlauf der Oxydation wurde manometrisch durch die Sauerstoffaufnahme verfolgt.

Wie man aus Abb. 27 sieht, wird ausser Nikotin (O_2 -Aufnahmegeschwindigkeit = $680 \mu l O_2 / \text{Stunde}$) nur Prolin ($200 \mu l O_2 / \text{Stunde}$) veratmet, allerdings erst nach einer einstündigen Induktionsperiode. Dies könnte für die Bildung eines Enzyms ausreichen. Die Sauerstoffaufnahme bei allen anderen Substanzen fällt dagegen mit dem Leerwert (ohne Substrat) zusammen. Sie werden also nicht veratmet. Die Fähigkeit, Prolin zu oxydieren, geht überdies beim Aufschluss der Bakterien verloren. Der zellfreie Extrakt nimmt mit Prolin als Substrat auch noch nach 7 Stunden (in Anwesenheit von Methylenblau) keinen Sauerstoff auf.

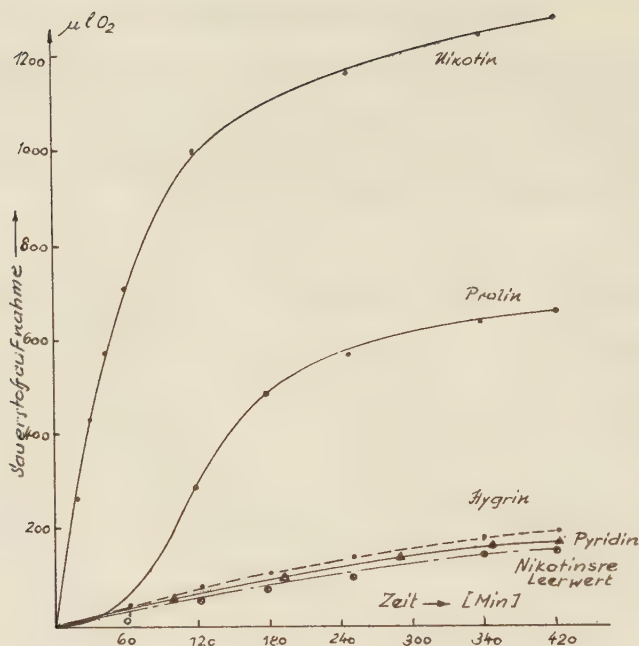


Abb. 27 Veratmung verschiedener Substanzen durch *Arthrobacter oxydans*.
Messung der Sauerstoffaufnahme in der Warburgapparatur bei 30°C .

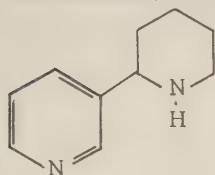
Zuss.: Hauptraum: 200 μM Phosphatpuffer pH 6.3, 0.4 ml Bakteriensuspension.
Seitenarm: 15 μM Phosphatpuffer pH 6.5, 8.5 μM Nikotin bzw. 10 μM Prolin, 10 μM Pyridin, 10 μM Nikotinsäure, 10 μM Hygrin.
Zentralraum: 600 μM KOH (0.15 ml); Ges.Vol. = 2.05 ml.

2. Substratspezifität des gereinigten Enzymsystems

Zur Messung der Substratspezifität wurden im optischen Test neben 250 μM Phosphatpuffer pH 6.5, 0.2 μM 2.6-Dichlorphenolindophenol und 52 γ angereicherten Enzyms 1 μM der zu prüfenden Substanz eingesetzt (Ges.Vol. = 2.0 ml).

1) Anabasin

Das Anabasin, das sich vom Nikotin durch den Piperidinring und das Fehlen der Methylgruppe unterscheidet, wird im Test mit der gleichen Geschwindigkeit wie Nikotin oxydiert.



Anabasin

Stöchiometrische Versuche ergaben allerdings (vgl. Tab. 6), dass pro Mol Anabasin nur ein Mol Farbstoff reduziert wird.

Es war also zu erwarten, dass nur die erste Hydroxylierung stattfindet. Wurde der Ansatz in der üblichen Weise chromatographiert, so fand sich nur ein Fleck im Chromatogramm mit dem R_f -Wert 0.5. Das Reaktionsprodukt zeigte die von 6-Hydroxynikotin her bekannte hellblaue Fluoreszenz unter der UV-Lampe. Abb. 28 (s.S. 50) zeigt das Spektrum des Anabasins und des vom Papier eluierten Reaktionsprodukts.

Tabelle 6

μM Anabasin eingesetzt	5	10	15	20	$\times 10^{-3}$
μM 2.6-Dichlorphenolind. reduziert	4.5	8.9	13.8	19.2	$\times 10^{-3}$

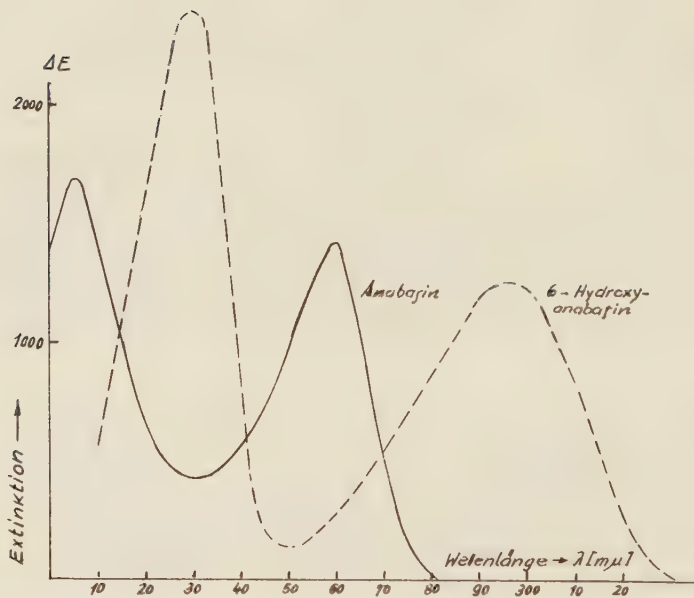
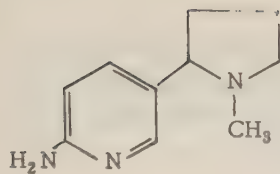


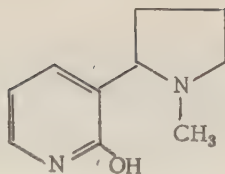
Abb. 28 Spektren von Anabasin und seinem Oxydationsprodukt
Anabasin $\cdot$ 81 μ / ml in Wasser, gegen reines Wasser $d = 1.0$ cm

Das Spektrum des Anabasins gleicht völlig dem des Nikotins, das seines Reaktionsprodukts völlig dem des 6-Hydroxynikotins. Ablauf der Reaktion und das Spektrum des Reaktionsprodukts sprechen dafür, dass bei der enzymatischen Reaktion 6-Hydroxyanabasin entstanden ist.

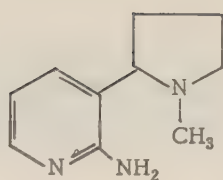
Im gleichen Test wurden auch 6-Aminonikotin (I), 2-Hydroxynikotin (II), 2-Aminonikotin (III), Nikotonjodmethylat (IV), β -Picolin (V), Nikotinsäure (VI), und Nikotinsäureamid (VII) auf ihre Substrateigenschaft geprüft.



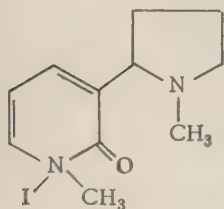
I



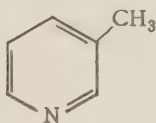
II



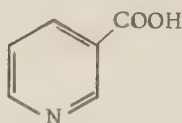
III



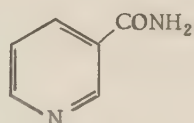
IV



V

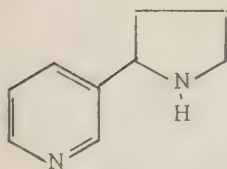


VI

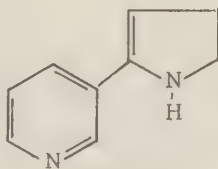


VII

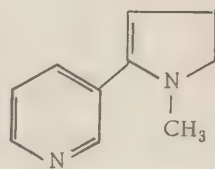
Alle Verbindungen erwiesen sich als enzymatisch inaktiv. - Sehr interessant war die Verwendung von Nornikotin und Myosmin und dessen N-Methylderivat als Substrat.



Nornikotin



Myosmin



N-Methyl-Myosmin

2) d,l-Nornikotin

Im kinetischen Test wurden $0.02 \mu\text{M}$ d,l-Nornikotin eingesetzt. In der 1. Minute wurden in einer raschen Reaktion zunächst $0.02 \mu\text{M}$ 2,6-Dichlorphenolindophenol verbraucht. Weitere $0.01 \mu\text{M}$ Redoxfarbstoff wurden dann in einer langsamen Reaktion (5 Minuten bis zum Stillstand) reduziert. Wie beim d,l-Nikotin werden also pro Mol Nornikotin 1.5 Mol Redoxfarbstoff verbraucht.

Nach der üblichen Aufarbeitung wurden die Reaktionsprodukte papierchromatographisch getrennt. Wie beim Nikotin wurden 3 Flecke im UV-Licht sichtbar. Der am langsamsten wandernde Fleck (R_f -Wert 0.37) erscheint dunkel und läuft direkt unterhalb des hellblau fluoreszierenden Flecks (R_f -Wert 0.42) und entspricht somit dem Produkt B beim Nikotinabbau. Der hellblau fluoreszierende Fleck entspricht dem 6-Hydroxynikotin und ist wohl 6-Hydroxy-nornikotin. Der am raschesten wandernde Fleck erscheint dunkel im UV-Licht (R_f -Wert 0.62) und ent-

spricht dem Produkt C des Nikotinabbaus. Das Eluat dieses Flecks zeigt fast genau das gleiche Spektrum wie das 3. Oxydationsprodukt des Nikotins, nur ist das charakteristische Maximum bei 358 m μ nach 348 m μ verschoben. Abb. 29 zeigt das Spektrum des Nornikotins sowie seines Endoxydationsproduktes.

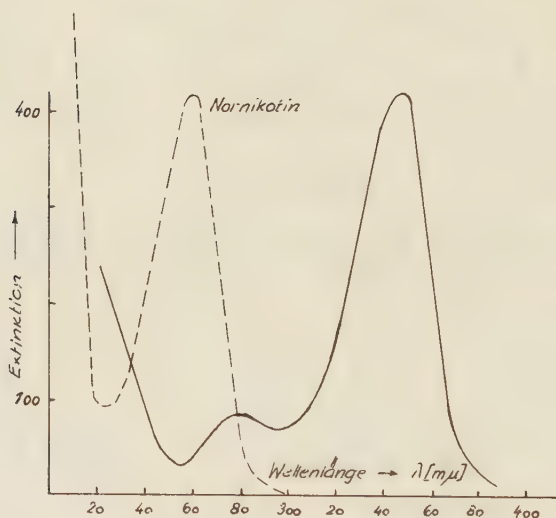


Abb. 29 Spektrum des Nornikotins und des Endprodukts (C)
der enzymatischen Nornikotinoxydation.

Nornikotin · 22 γ / ml in m/15 Phosphat pH 7,0 gegen den reinen Puffer.

3) Myosmin (optisch inaktiv)

Das Enzym vermag auch Myosmin mit 2,6-Dichlorphenolindophenol zu oxydieren.

Werden 0.011 μM eingesetzt, so werden 0.013 μM Redoxfarbstoff verbraucht, was einem stöchiometrischen Umsatz von 1 : 1 entspricht. Wird der Ansatz wie üblich aufgearbeitet und chromatographiert, so findet man als Reaktionsprodukt keine hellblau fluoreszierende Substanz mit dem R_f-Wert bei 0.36 wie in den Ansätzen mit Nikotin, Nornikotin und Anabasin, entsprechend einer 6-Hydroxyverbindung, sondern nur ein rasch wanderndes Produkt (R_f-Wert 0.60), das im gefilterten UV-Licht dunkel erscheint und in beiden Eigenschaften dem Produkt C

der Nikotinoxydation gleicht. Die eluierte Verbindung besitzt ausserdem das gleiche Spektrum (Maximum bei 348 m μ) wie das letzte Oxydationsprodukt des Nor-nikotins (Maximum bei 348 m μ). In Abb. 31 (s.S. 54) sind die Spektren des Myosmins und seines Oxydationsprodukts wiedergegeben.

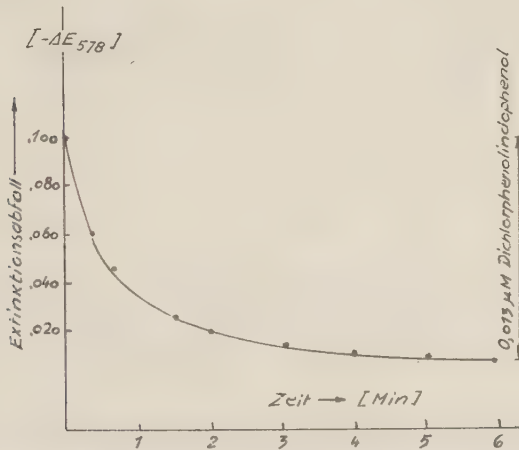


Abb. 30 Kinetik der enzymatischen Myosmin-Oxydation

Zuss.: 0.2 μ M Dichlorphenolindophenol, 250 μ M Phosphatpuffer pH 6.5, 86 γ angereichertes Enzym, 0.011 μ M Myosmin. Vol. = 2.0 ml.

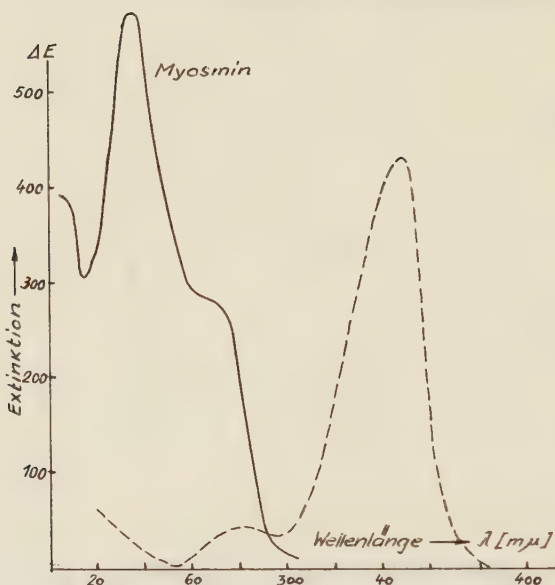
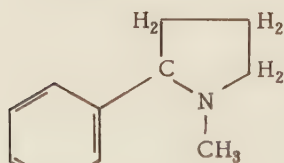


Abb. 31 Spektrn des Myosmins und seines Oxydationsprodukts
(Eluat vom Papierchromatogramm)

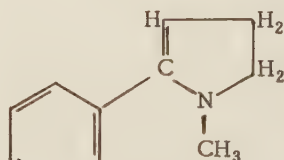
Myosmin, 7.75 μ / ml in Wasser gegen Wasser. Vol. = 2.0 ml, d = 1.0 cm.

4) N-Methylmyosmin (optisch inaktiv)

Diese interessante Beobachtung, wonach die Oxydation von Nornikotin und Myosmin (nach Verbrauch von der doppelten bzw. einfachen Menge Redoxfarbstoff) das gleiche Reaktionsprodukt liefert, legte Versuche mit N-Methylmyosmin nahe, das sich zu Nikotin verhält wie Myosmin zu Nornikotin.

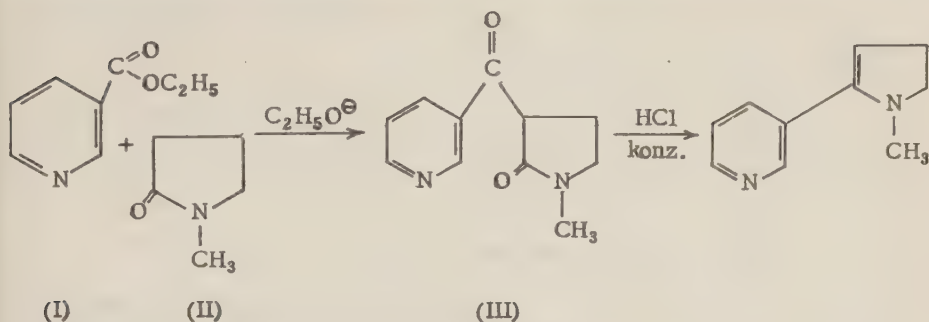


Nikotin



N-Methyl-Myosmin

N-Methylmyosmin ist nach SPÄTH und BRETSCHNEIDER (35) durch Kondensation von Nikotinsäureäthylester (I) und N-Methylpyrrolidon (II) und Behandlung des entstandenen Ketons (III) im Bombenrohr mit starker Salzsäure zugänglich.



Wie bei HAINES und EISNER (36) hatte das aus Wasser kristallisierte Pikrat den Schmelzpunkt von 130°C , bei Kristallisation aus abs. Methanol den Schmelzpunkt 158°C (Kofler). Das Spektrum der Verbindung stimmte mit dem des Myosmins überein.

Wurden $2\text{ }\mu\text{M}$ N-Methylmyosmin mit 2,6-Dichlorphenolindophenol und Enzym inkubiert, so kam die rasche Reaktion nach Verbrauch von $2.2\text{ }\mu\text{M}$ Farbstoff zum Stillstand.

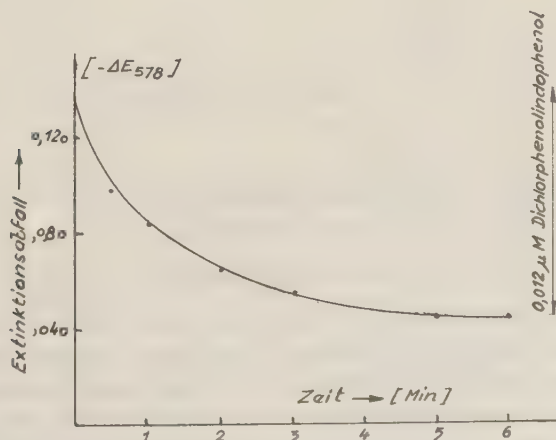


Abb. 32 Kinetik der enzymatischen N-Methylmyosmin-Oxydation

Zuss.: $0.2\text{ }\mu\text{M}$ Dichlorphenolindophenol, $250\text{ }\mu\text{M}$ Phosphatpuffer pH 6.5, $170\text{ }\gamma$ angereichertes Enzym, $0.01\text{ }\mu\text{M}$ N-Methylmyosmin.

Im Papierchromatogramm war ein im UV-Licht (gefiltert) dunkel erscheinender Fleck mit dem R_f -Wert von 0.59 zu erkennen, dessen Eluat das gleiche Spektrum wie das Produkt C der Nikotinoxydation zeigt (Abb. 33).

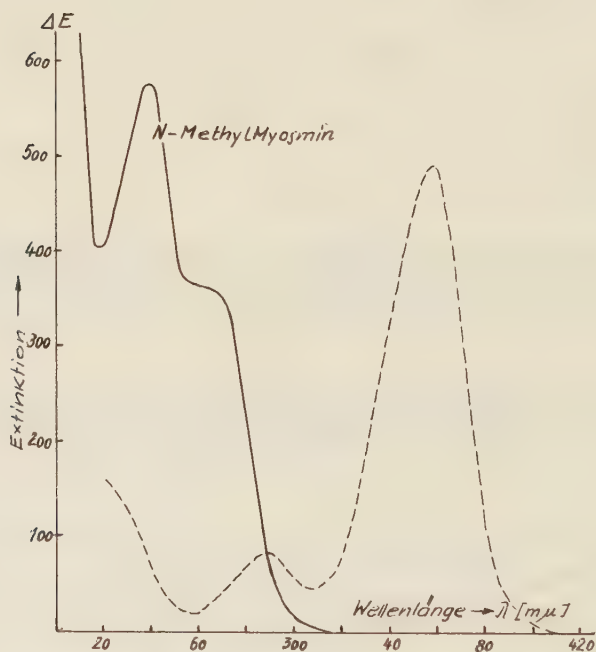


Abb. 33 Spektrum von N-Methylmyosmin und seinem
enzymatischen Oxydationsprodukt.

N-Methylmyosmin 0.0133 mg/ml in H_2O ; $d = 1.0$ cm.

Die Identität des Oxydationsprodukts von N-Methylmyosmin mit dem Produkt C der Nikotinoxydation liess sich papierchromatographisch weiter sichern. Beide Verbindungen besaßen in den nachstehend aufgezählten Lösungsmittelsystemen (48) den gleichen R_f -Wert. Damit ist nachgewiesen, dass bei der enzymatischen Oxydation des N-Methylmyosmins mit 2,6-Dichlorphenolindophenol das gleiche Produkt gebildet wird wie bei der Oxydation von Nikotin. Zu seiner Entstehung werden allerdings im Fall des Nikotins zwei Äquivalente Farbstoff reduziert, im Fall des N-Methylmyosmins jedoch nur eines.

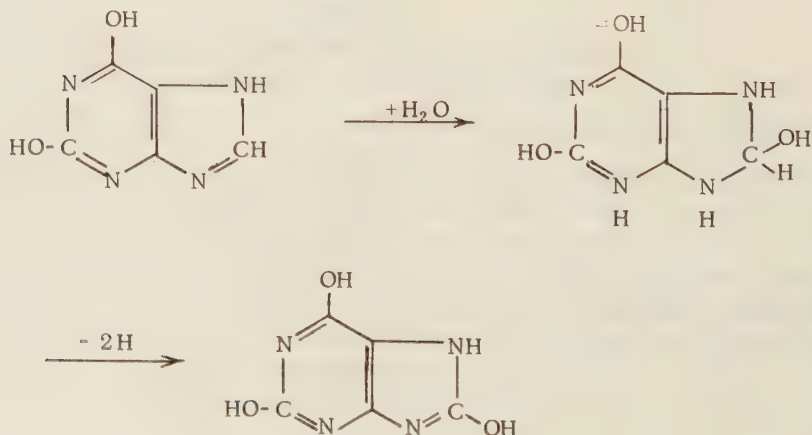
Fließmittel-System	Papier	R _f Oxydationsprodukt	
		N-M-Myosmin	Nikotin
1) wassergesättigtes Butanol	Whatman I unbesprüht	0.62	0.62
2) Butanol / Eisessig / Wasser 100 / 10 / gesätt.	Whatman I besprüht mit 0.2m Acetat pH 5.6	0.78	0.78
3) Butanol / Benzol / 0.2m Acetat pH 5.6 85 / 5 / 30	Whatman I besprüht mit 0.2m Acetat pH 5.6	0.33	0.33
4) tert.Amylalkohol / 0.2m Acetat pH 5.6 1 / 1	Whatman I a) besprüht 0.2m Acetat pH 5.6 b) besprüht 0.2m Ammontartrat	0.5 0.7	0.5 0.7
5) Butanol / Pyridin / Wasser 3 / 1 / 3	Whatman I besprüht mit 0.2m Acetat pH 5.6	0.68	0.68
6) 0.2m Acetat gesätt. Butanol pH 5.6	Whatman I besprüht mit 0.2m Acetat pH 5.6	0.21	0.21
7) Methanol / Isoamylalkohol / Benzol 31 / 15 / 50	Whatman I besprüht mit 0.2m Ammontartrat	0.56	0.56

VI. Diskussion

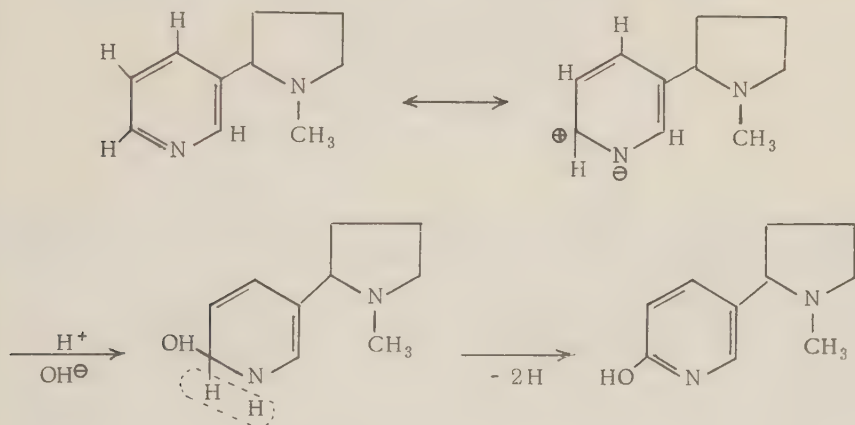
Durch die Verwendung zellfreier Extrakte und eines gereinigten Enzympräparats ist es gelungen, einen Teil des Abbauwegs des Nikotins in eine Reaktionsfolge mit definierten Zwischenstoffen aufzulösen. Eine grosse Hilfe war die Benutzung des Redoxfarbstoffs 2,6-Dichlorphenolindophenol. Durch ihn wurde die Reaktionsfolge im Rohextrakt auf drei leicht erkennbare Teilschritte beschränkt, bei denen weder Kohlendioxyd noch Ammoniak abgespalten werden.

Das erste auf diesem Weg auftretende Zwischenprodukt ist zweifelsfrei aufgeklärt und mit 6-Hydroxynikotin identisch wie durch Vergleich mit authentischem 6-Hydroxynikotin bewiesen wurde. Nach Abschluss der eigenen Arbeiten erschien eine Veröffentlichung von HOCHSTEIN und RITTENBERG (17, 18), die ebenfalls den mikrobiologischen Nikotinabbau mit zellfreien Extrakten untersuchten. Der von ihnen als P 34 bezeichnete, aus Bodenproben isolierte Bakterienstamm verwertete Nikotin als einzige Kohlenstoff- und Stickstoffquelle. Es gelang ihnen, als ein Produkt des Nikotinabbaus durch intakte Bakterien oder durch zellfreie Extrakte linksdrehendes 6-Hydroxynikotin zu isolieren. Lediglich der Schmelzpunkt des von ihnen isolierten 6-Hydroxynikotins (Fp. 119.5-121.5°C) differiert von dem von mir, FRANKENBURG (7) und TSCHITSCHIBABIN (28) angegebenem Schmelzpunkt von etwa 105°C. HOCHSTEIN und RITTENBERG (17, 18) vermuten, dass die optischen Antipoden einen höheren Schmelzpunkt als das Razemat besitzen.

Die Verwertung des Redoxfarbstoffs beim 1. Oxydationsschritt schliesst einen Oxygenierungsprozess aus, wozu molekularer Sauerstoff notwendig ist. Es liegt vielmehr näher, nach dem Vorbild des WIELANDschen Mechanismus der Xanthinoxidation (Xanthinoxidase) (37, 38)



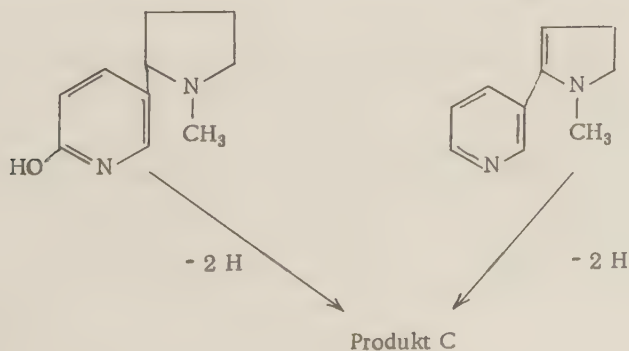
anzunehmen, dass zunächst eine Wasseranlagerung stattfindet, der sich eine Dehydrierung anschließt.



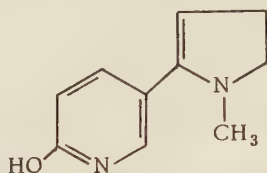
Dieser Mechanismus wird auch von HOCHSTEIN und RITTENBERG (17, 18) diskutiert. Auch im Falle der mikrobiologischen Oxydation von Nikotinsäure (39) hat der Sauerstoff der Hydroxylgruppe seinen Ursprung im Wasser und nicht im molekularen Sauerstoff, wie von HUNT und HUGHS (40, 41) durch Versuche mit $^{18}O_2$ und $H_2^{18}O$ gezeigt wurde.

Die beiden nächsten Reaktionsschritte sind in ihrem Chemismus noch nicht so klar. Zunächst soll die chemische Natur des besser untersuchten Produkts C erörtert werden.

Wie meine Versuche ergaben, entsteht aus 6-Hydroxynikotin und N-Methyl-Myosmin durch Verbrauch von einem Äquivalent Farbstoff das gleiche Endprodukt.



6-Hydroxynikotin und N-Methyl-Myosmin stehen also auf der gleichen Oxydationsstufe. Die naheliegende Annahme, dass das Produkt C 6-Hydroxy-N-Methyl-Myosmin ist,



erwies sich durch den Vergleich der gefundenen mit den für 6-Hydroxy-N-Methyl-Myosmin berechneten Analysenwerten als nicht richtig.

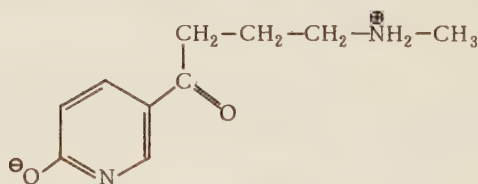
6-Hydroxy-N-Methyl-Myosmin
(berechnet)

C: 68.2
H: 6.82
N: 15.9
O: 9.1

Produkt C
(gefunden)

C: 61.65; 62.20; 61.93
H: 6.50; 6.58; 6.29
N: 14.77
O: 17.08; 16.45; 17.01

Das Produkt enthält demnach mehr Sauerstoff, als dem 6-Hydroxy-N-Methyl-Myosmin zukäme. Dies legt nahe, dass bei seiner Bildung Wasser aufgenommen wurde, was zu folgendem Strukturvorschlag führt:



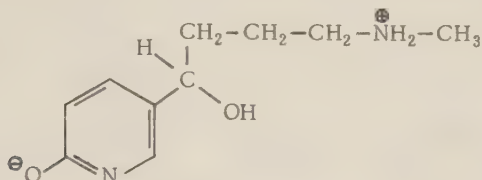
3-Methylaminopropyl-3-(6-Hydroxy)-pyridylketon

Folgende Befunde stützen diese Hypothese:

- Die Werte der Verbrennungsanalyse sind im Einklang mit der vorgeschlagenen Formel:

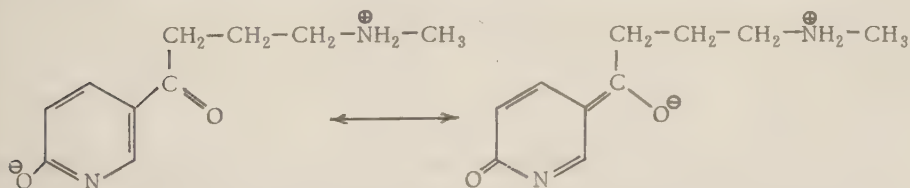
Gefunden:	C 61.9	H 6.46	N 14.77	O 16.8
Berechnet:	C 62.0	H 7.2	N 14.4	O 16.5

- 2) Das bei der Reduktion des Produkts C mit Kaliumboranat entstehende Reaktionsprodukt zeigt ein UV-Spektrum (Abb. 20, S. 37), das dem des Produkts B in diesem pH-Bereich (Abb. 16, S. 31) gleicht. Da das Produkt C aus dem Produkt B durch eine enzymatische Dehydrierung hervorgeht, ist für das Produkt B nachstehende Formel in Betracht zu ziehen:



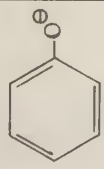
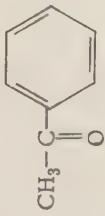
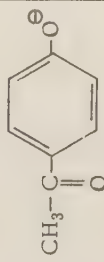
- 3) Charakteristisch für die Bildung des Produkts C aus dem Produkt B ist die Verschiebung des Absorptionsmaximums im UV zum längerwelligen Bereich unter gleichzeitiger starker Zunahme der Extinktion. Leider sind die Spektren der vorgeschlagenen oder analogen Verbindungen nicht bekannt. Doch kann man den beobachteten bathochromen Effekt an Modellverbindungen sehen, deren Werte mit den von mir an meinen Verbindungen beobachteten in der Tabelle 7 zusammengestellt sind (42, 43). (s.S. 63).

Durch den Übergang des Carbinols in das γ -Methylaminopropyl-3-(6-Hydroxy)-pyridylketon wird die Resonanz im System sehr verstärkt



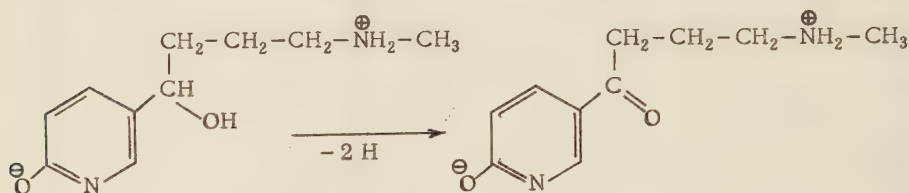
und das Maximum der Absorption unter Zunahme der Extinktion zu längeren Wellen hin verschoben.

Alle diese Überlegungen führen zu der Annahme, dass bei der enzymatischen Umwandlung des 6-Hydroxynikotins in das Produkt B der Pyrrolidinring geöffnet wird. Dieser Weg der hydrolytischen Lösung der $>C-N<$ -Bindung durch die Zelle wäre neuartig. Ein Analogon dieser Reaktion (Substitution der Ammoniumgruppe gegen die Hydroxylgruppe) ist in der organischen Chemie der anormale HOF-MANN-Abbau (MENSCHUTKIN-Reaktion) (45). Diese Reaktion, die beim Behandeln der Ammoniumverbindung mit Silberoxyd in wässrigem Milieu abläuft, findet man bei Verbindungen, bei denen Stickstoff an einen Allyl- oder Benzylrest gebunden ist (46, 47), z.B.:

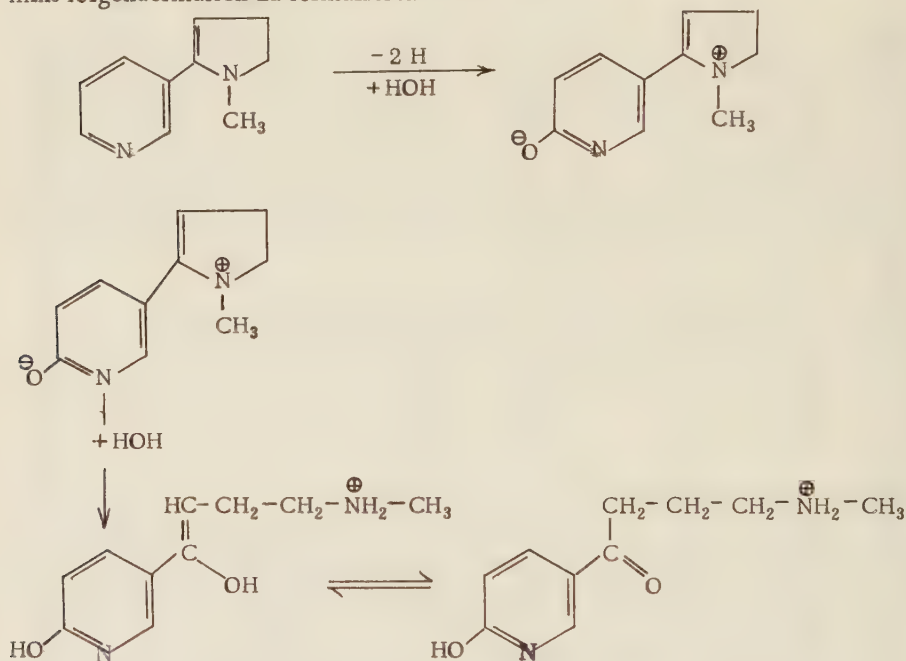
Lit.	λ (m μ)	ϵ [cm ² / Mol]	λ (m μ)	ϵ [cm ² / Mol]	
(42)	291	$2.36 \cdot 10^6$	297	$6.2 \cdot 10^6$	
(43)	242	$9.8 \cdot 10^6$	263	$5.3 \cdot 10^6$	 Lit. (36)
(42)	327	$25 \cdot 10^6$	358	$29 \cdot 10^6$ x)	

x) Berechnet aus dem gemessenen spez. Extinktionskoeffizienten und dem Molekulargewicht der vorgeschlagenen Konstitutionsformel.

In der letzten Reaktion findet eine enzymatische Dehydrierung des Produkts B zu γ -Methylaminopropyl-3(6-Hydroxy) Pyridylketon statt:



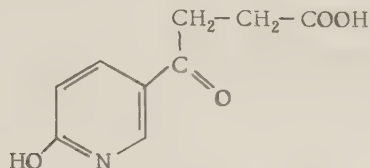
Diese geäusserten Vorstellungen führen dazu, die Oxydation des N-Methyl-Myosmins folgendermassen zu formulieren:



Im 6-Hydroxy-N-Methylmyosmin als Enamin könnte die -C-N- Bindung sehr leicht hydrolytisch geöffnet werden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass das Enzym, welches diesen Schritt katalysiert, verschieden ist von dem, das die hydrolytische Aufspaltung des 6-Hydroxynikotins nach Art der MENSCHUTKIN-Reaktion bewirkt.

Nornikotin und Myosmin reagieren in ganz analoger Weise.

Mit dem hier postulierten Reaktionsschema steht die von verschiedenen Autoren TABUCHI (11), FRANKENBURG, VAITEKUNAS (7) und HYLIN (16) gemachte Beobachtung im Einklang, dass 3-Succinoyl-6-Hydroxypyridin



ein Zwischenprodukt des Nikotinabbaus ist. Der Übergang des γ -Methylamino-propyl-3-(6-hydroxy)-pyridylketons in 3-Succinoyl-6-Hydroxypyridin durch oxydative Desaminierung liegt sehr nahe. Nach weiteren Abbauschritten könnte 6-Hydroxynikotinsäure gebildet werden, die nach Untersuchungen von BEHRMANN und STANIER (39) an *Pseudomonas fluorescens* N-9, über 2.5-Dihydroxypyridin letztlich zu Fumarsäure abgebaut wird. Damit wäre der Anschluss an den Citronensäurecyclus, einen Hauptweg des Zellstoffwechsels, erreicht.

Methoden

1. Züchtung der Bakterien im Grossansatz

Isolierung, Reinzüchtung und Konservierung des Bakteriums sind in einer früheren Arbeit (1) beschrieben.

Zur Züchtung der Bakterien in Massenkultur wurden 5 2-Liter-Erlenmeyerkolben mit 1 Liter der folgenden Nährlösung sterilisiert und mit *Arthrobacter oxydans* beimpft:

Nährlösung:

50 ml Standardsalzlösung^{x)}, 2 g 1-Nikotin (Th. Schuchardt, aus Tabakablaugen); das pH der Lösung wird mit 0.5m Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4) auf pH 6.5 gebracht; Endvolumen 1 Liter.

Es wurde 3-4 Tage unter wiederholtem kräftigen Schütteln (Sauerstoffzufuhr) bebrütet. Die Lösung färbte sich in dieser Zeit tiefviolett. Mit dieser Vorkultur wird ein 40-Ltr.-Ballon, der mit 20 Litern nicht sterilisierter Nährlösung gefüllt war, beimpft. Durch die spezielle Zusammensetzung des Mediums und die grosse Menge Vorkultur waren die Vermehrungsbedingungen für andere Mikroorganismen sehr schlecht. Der Ansatz wurde in einem Wasserbad $2\frac{1}{2}$ -3 Tage bei 30°C inkubiert, wobei mittels Druckpumpe und Glasfritte ständig Luft durch die Bakteriensuspension geblasen wurde. Die Ein- und Austrittsöffnungen waren mit Wattefiltern versehen.

Die Bakterien wurden in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet. Später entnommene Bakterien adsorbieren den blauen Farbstoff irreversibel; die Enzym-

x) Standardsalzlösung

14-15 g Äthylendiamintetraessigsäure (Trilon B) werden mit der notwendigen Menge 4m KOH in Lösung gebracht und unter Zugabe von Wasser folgende Salze darin gelöst:

		g
CaCl_2	p.A.	1.5
H_3BO_3	DAB6	9.16
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	reinst	7.04
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.A.	0.44
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.A.	0.48
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.A.	0.20
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.A.	40.0
Na_2MoO_4	p.A.	0.444
CoCl_2	reinst	0.212
K_2HPO_4	p.A.	4.0

Endvolumen 2 Liter; das pH der Salzlösung soll 7.0 betragen.

aktivität in Extrakten solcher Bakterien war stark erniedrigt.

Die Zellen werden mit einer Durchlaufzentrifuge geerntet (Schwerefeld 50 000 g) und 3-4mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Man erhält eine feste gelblich-weiße Masse.

Ausbeute: 35-40 g feuchte Bakterien/25 Liter.

Die Bakterien konnten, bei -18°C eingefroren, ohne Verlust der Enzymaktivität aufbewahrt werden.

2. Darstellung zellfreier Extrakte (alle Operationen zwischen $0-20^{\circ}\text{C}$)

a) durch Aufschluss der Bakterien mit Aluminiumoxyd

1.5 g feuchte Bakterienzellen werden 20 Minuten lang mit der 1.5fachen Gewichtsmenge Al_2O_3 -Pulver (Alumina a 303^x) im vorgekühlten Porzellanmörser intensiv verrieben. Die beim Zerreiben erhaltene Paste wird anschliessend mit 2.5 ml eiskaltem 0.05m Phosphatpuffer (pH 7.5) 10 Minuten lang digeriert und dann 5 Minuten lang bei 22 000 g zentrifugiert. Der Rückstand wird in der gleichen Weise nochmals extrahiert. Es resultiert ein dunkelgelb gefärbter opaleszierender Extrakt mit ca. 15-25 mg Protein (Vol. = 4.0 ml).

b) durch Aufschluss mit dem mechanischen Zellhomogenisator (20)

Alle Operationen zwischen $0-20^{\circ}\text{C}$

4-5 g der eingefroren aufbewahrten Bakterien werden in 15 ml eiskaltem 0.05m Phosphatpuffer pH 6.85 suspendiert und mit 40 g (bei 0°C vorgekühlten) Glasperlen^{xx}) im Homogenisiergefäß 90-120 Sekunden lang, unter kontinuierlicher Kühlung mit festem CO_2 , zerschlagen (20). Die erhaltene Suspension, die manchmal schaumig ist, wird in einer Becherzentrifuge 10 Minuten lang bei 6 000 g zentrifugiert. Die über den abgeschleuderten Glasperlen und Zelltrümmern stehende tief dunkelgelbe Flüssigkeit wird abgehebert. Der gesamte Rückstand wird 2- oder 3mal mit je 10 ml eiskaltem 0.05m Phosphatpuffer pH 6.85 aufgerührt und 10 Minuten lang bei 6 000 g sedimentiert.

Die Überstände werden vereinigt und abschliessend 5 Minuten lang bei 22 000 g zentrifugiert. Man erhält 40-60 ml dunkelgelben opaleszierenden Rohextrakt pH 7.0

^x) Aluminium Company of America, Pittsburg

^{xx}) Reflexperlen 31/12 des Dragonwerks Wild, Bayreuth

mit 6-8 mg Protein/ml. Nach dieser Methode erhält man 5mal mehr lösliches Protein aus den Bakterien, als mit dem Aluminiumoxyd-Aufschluss.

3. Optischer Test der Nikotinoxydation

Zu 0.5 ml 0.5m Phosphatpuffer pH 6.5 in einer $d = 1,0$ cm Glasküvette werden $0.2 \mu\text{M}$ 2,6-Dichlorphenolindophenol (Merck p.A.) und die zu prüfende Enzymlösung gegeben; mit Wasser wird auf 1.9 ml aufgefüllt (Vol. der Küvette 3.0 ml). Die Reaktion wird mit $1 \mu\text{M}$ l-Nikotin (0.1 ml) gestartet und die Abnahme der Extinktion im Photometer Eppendorf bei 578 m μ zwischen der 1. und 5. Minute verfolgt. Die Vergleichsküvette enthält kein Nikotin.

Als Aktivitätseinheit wird diejenige Menge Enzym definiert, die eine Abnahme der Extinktion von 0.001/Minute verursacht.

Die spezifische Aktivität der Enzympräparate ist in Enzymeinheiten pro mg Protein ausgedrückt.

Die Proteinkonzentration in der Enzymlösung wurde mittels der Biuretmethode nach der Vorschrift von BÜCHER (47) oder durch das Extinktionsverhältnis $\Delta E_{280} / \Delta E_{260}$ nach WARBURG und CHRISTIAN (21) bestimmt.

Die Methoden lieferten übereinstimmende Werte.

Der optische Test kann auch zur Mikrobestimmung von Nikotin benutzt werden. In diesem Falle wird neben einem Überschuss von aktivem Enzym die auf Nikotin zu prüfende Lösung eingesetzt. Es können noch bequem $0.0025 \mu\text{M}$ Nikotin (0.41γ) im Test erfasst werden.

4. Reinigung des Systems der Nikotinoxydation (Alle Operationen zwischen 0-20°C)

a) Fraktionierte Protaminfällung

Der mit dem Zellhomogenisator erhaltene Rohextrakt wird mit 0.05m Phosphatpuffer pH 6.85 auf eine Proteinkonzentration von 2.2-2.4 mg/ml gebracht. Zu dieser Lösung gibt man langsam unter ständigem Rühren 0.05proz. Protaminsulfatlösung und zwar 0.667 ml Protaminsulfatlösung auf 1 ml des verdünnten Rohextrakts. Die Fällung lässt man bei 0°C etwa 40 Minuten stehen und zentrifugiert darauf 5 Minuten lang bei 22 000g. Der Niederschlag wird verworfen. Die klare, leicht opaleszierende Lösung enthält die gesamte Enzymaktivität und alles Protein. Zu dieser Lösung (Proteinkonzentration 1.3 mg/ml) tropft man pro ml unter Rühren 0.135 ml 0.05proz. Protaminsulfatlösung. Den Niederschlag lässt man etwa 40 Minuten stehen und sedimentiert ihn dann 5 Minuten lang bei 22 000g. Der klare opaleszierende Überstand ist im Test mit l-Nikotin inaktiv.

Der Niederschlag wird mit ca. 2,5 ml kalt gesättigtem Natriumbicarbonat (6,9 g/100 ml bei 0°C) extrahiert und darauf 5 Minuten lang bei 22000g zentrifugiert. Die Extraktion wird 3-4mal wiederholt. Die dunkelgelb gefärbten Überstände werden vereinigt.

Der Bicarbonatextrakt (pH 8,3) wird durch Zugabe von 0,5m Phosphatpuffer pH 5,0 auf ein pH von 6,8 gebracht und dann 2 Stunden lang gegen 0,005m Phosphatpuffer pH 6,8, bei einmaliger Erneuerung des Puffers dialysiert.

b. Geladsorption

Zu der dialysierten Enzymlösung mit einer durchschnittlichen Proteinkonzentration von 3,3-3,6 mg/ml werden pro ml 0,1-0,15 ml Calciumphosphatgel nach KUNITZ (22) zugegeben (Trockengewicht 19 mg/ml); nach 15-30 Minuten wird 5 Minuten lang bei 22000g zentrifugiert. Die Aktivität ist im Überstand. Durch die Gelzugabe wird das pH etwas nach der alkalischen Seite hin verschoben. Es wird mit ein paar Tropfen K_2HPO_4 auf pH 6,8 zurückgebracht.

c. Fraktionierung mit Ammoniumsulfat

Zur Ammoniumsulfatfällung wurde 2mal mit Trilon B umkristallisiertes und feinst pulverisiertes $(NH_4)_2SO_4$ verwendet. Die erforderliche Menge wurde nach der Formel

$$\frac{V \cdot 1,77 \cdot (S - s)}{3,54 - S} = g \quad (\text{Ammonsulfat})$$

berechnet.

V = Volumen der Lösung; S = die gewünschte Sättigung (in Bruchteilen von 1);
s = die Ammonsulfatsättigung der Ausgangslösung (in Bruchteilen von 1).

Die bis zu 40% Sättigung auftretende Fällung wird verworfen, die Fällung zwischen 40-70% Sättigung wird in 0,05m Phosphatpuffer pH 6,8 aufgenommen.

In Tabelle 3 (s.S. 17) ist ein typischer Anreicherungsang wiedergegeben.

5. Papierchromatographie

In Anlehnung an die bekannten Methoden zur Papierchromatographie von Tabakalkaloiden nach EISNER, PORTER und NAGHSKI (49), TSO und JEFFREY (50), WEGNER (51), WERLE und KOCH (52), MUNIER und MACHEBEUF (53), LEISERSON und WALKER (25) und JATZKEWITZ (24) wurde ein papierchromatographisches Trennungsfahrhen entwickelt, das sich zur Identifizierung, Auftrennung und Isolierung der aufgefundenen Abbauprodukte bestens bewährt hat.

Das Fliessmittel ist n-Butanol/Eisessig/Wasser, wobei Butanol mit Eisessig im Volumverhältnis 10 : 1 gemischt wird. Diese Mischung wird mit Wasser gesättigt. 100 ml Butanol und 10 ml Eisessig erfordern etwa 30 ml Wasser zur Sättigung.

Das Papier (Whatman I, Schleicher und Schüll 2043a, 2043b) wurde mit 0.2m Natriumacetatpuffer pH 5.6 gleichmässig besprüht und bei Raumtemperatur über Nacht, oder bei 50°C im Umlufttrockenschrank getrocknet. Die Proben wurden 3.5 cm vom unteren Rand des Papiers entfernt aufgetragen. Danach wurden die Chromatogramme 45 Minuten lang einer mit Wasserdampf gesättigten Atmosphäre ausgesetzt. Es wurde aufsteigend bei 25°C chromatographiert.

Zur Rechromatographie der als Produkt C bezeichneten Substanz, die in präparativem Masstab papierchromatographisch gereinigt wurde, verwendete ich wasser-gesättigtes Butanol als Fliessmittel und gewaschenes Papier (Schleicher u. Schüll, 2043a, ausgewaschen). Dabei bleibt das aus der 1. Chromatographie stammende Natriumacetat, das etwas in Alkohol löslich ist und daher beim Verreiben des getrockneten Eluats mit Alkohol nicht abgetrennt wird (Löslichkeit von Na-Acetat in Alkohol 2.1 g/100 ml bei 18°C), an der Auftragstelle sitzen, wie sich durch Besprühen des Papiers mit einer alkoholischen Lösung von Methylrot zeigen lässt.

Zur Sichtbarmachung der einzelnen Komponenten wurden folgende Sprüh-reagenzien benützt:

1. Kaliumtetraiodobismutat (Draggendorf-Reagens)

Lösung A: 850 mg Wismutsubnitrat $\text{Bi}(\text{OH})_2\text{NO}_3$ in 10 ccm Eisessig und 40 ccm Wasser.

Lösung B: 8g KJ in 20 ccm Wasser.

Lösung A + B geben die Stammlösung, die in brauner Flasche aufbewahrt unbegrenzt haltbar ist. Vor dem Sprühen mischt man 1 ccm Stammlösung mit 2 ccm Eisessig und 10 ccm Wasser.

Mit Nikotin entsteht eine kräftige ziegelrote Färbung. 6-Hydroxynikotin sowie Produkt C und B geben erst in etwas höherer Konzentration eine orange gelbe Farb-reaktion.

2. Bromcyanreaktion (26, 1)

Das luftgetrocknete Chromatogramm wird bei Raumtemperatur 15 Minuten lang in einen verschlossenen Glaszylinder, der einige Kristalle von Bromcyan enthält, gehängt. Anschliessend besprüht man das Chromatogramm mit 0.25proz. Benzidin-lösung in Äthanol/Wasser 1:1.

Mit Nikotin entsteht eine gelbrote Färbung.

3. Ninhydrinreagens

0.2proz. Ninhydrinlösung in wassergesättigtem n-Butanol. Nach dem Besprühen wird 1 Minute lang in feuchter Atmosphäre auf 90°C erhitzt.

Die Aminosäuren geben rotviolette Flecken, Produkt B färbt sich rosa an.

4. Eisen-III-chlorid-Reagens

5proz. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Lösung in 95proz. salzsaurem Äthanol (HCl-Endkonzentration 0.1n).

Produkt C gibt eine dunkelviolette Färbung, 6-Hydroxynikotin eine gelbe Farb-reaktion.

6. Isolierung und Kristallisation des Produkts A

100 μM 1-Nikotin werden mit 4000 μM Phosphatpuffer pH 6.5, 30 ml Wasser und 0.35 ml angereichertem Enzym (2.36 mg Protein) inkubiert und insgesamt 100 μM 2,6-Dichlorphenolindophenol (27 ml; 1.0 mg/ml) nach Massgabe seiner Entfärbung rasch zugesetzt. Nach der letzten Zugabe wurde das Gemisch 30 Minuten lang mit Äther perforiert, wobei überschüssiges Dichlorphenolindophenol entfernt wird. Es löst sich in Äther mit violetter Farbe. Der in der nahezu farblosen wässrigen Lösung verbliebene Äther wird mit einem Stickstoffstrom verjagt und die Lösung dann gefriergetrocknet. Der staubtrockene Rückstand wird mit 96proz. Äthanol so lange extrahiert (ca. 10mal mit 0.6 ml), bis keine bei 295 m μ absorbierende Substanz mehr in Lösung geht. Der alkoholische Extrakt wird auf das Papier als Streifen aufgetragen (5 Bogen Whatman I oder S u. S 2043a) und in dem oben beschriebenen Fließmittelsystem 22 Stunden lang chromatographiert.

Die im UV-Licht sichtbaren Banden der Produkte (Hauptmenge Produkt A $R_f = 0.32$; geringer Anteil Produkt C $R_f = 0.51$) werden nach dem Trocknen des Papiers mit destilliertem Wasser in der von CRAMER (54) beschriebenen Weise eluiert. Das Eluat (etwa 20 ml) enthielt 27 μM Produkt A. Der nach dem Gefrier-trocknen hinterbliebene ölige Rückstand konnte aus Ligroin als Lösungsmittel in Form farbloser Tafeln zur Kristallisation gebracht werden. Schmp. 102-103.5°C (Kofler).

7. Chemische Synthese von 6- und 2-Hydroxynikotin nach TSCHITSCHIBABIN und KRISSANOW (28)

a) Darstellung von 6- und 2-Aminonikotin

25 g frisch destilliertes Nikotin werden im 250-ml-Rundkolben in 50 ml Xylol (über Natrium getrocknet) gelöst und mit 12 g fein pulverisiertem Natriumamid versetzt. Das Gemisch wird am Rückfluss unter Feuchtigkeitsausschluss erwärmt.

Bei 135°C im Reaktionsgemisch beginnt eine rege Wasserstoffentwicklung, die nach 4-5 Stunden beendet ist. Das Gemisch wird vorsichtig mit wenig Eiswasser behandelt, mit Salzsäure versetzt (140 ml HCl 35proz., 1:1 verdünnt) und das Xylol von der wässrigen Schicht mit dem Scheidetrichter abgetrennt. Die wässrige Lösung wird mit NaOH neutralisiert, mit Kaliumcarbonat übersättigt und 7-8mal mit 60 ml Äther extrahiert. Nach Abziehen des Äthers verbleibt ein dunkelgelbes Öl. Beim Versetzen desselben mit Wasser scheidet sich das in kaltem Wasser schwer lösliche 2-Aminonikotin aus. Die Kristalle werden aus Ligroin umkristallisiert.

Ausbeute 5 g, Schmp. 124-125°C

Das über Nacht bei 0°C gehaltene Filtrat (Abscheidung von restlichen geringen Mengen 2-Aminonikotin) wird erneut mit Kaliumcarbonat gesättigt und mit Äther extrahiert. Der Äther wird abdestilliert und der Rückstand i.V. bei 12 Torr fraktioniert. Nach TSCHITSCHIBABIN (28) besteht die bei 160-170°C i.V. übergehende Fraktion aus reinem 6-Aminonikotin.

Ausbeute 9.7 g wie in (28) angegeben.

b) Darstellung von 6- und 2-Hydroxynikotin

Das 6-Aminonikotin wird mit 5n Salzsäure gegen Kongopapier neutralisiert und das getrocknete und gepulverte Hydrochlorid aus heissem Alkohol umkristallisiert.

2 g 6-Aminonikotin-hydrochlorid werden in 16 ml 5proz. Schwefelsäure gelöst und im Laufe von 4-5 Stunden unter Eiskühlung die Lösung von 6.6 g Natriumnitrit in 10 ml Wasser zugetropft. Danach wird die Lösung 30 Minuten auf 50°C erwärmt, mit Soda neutralisiert und zur Trockne eingedampft. Aus dem Rückstand wird das 6-Hydroxynikotin mit kochendem Ligroin extrahiert. Beim Abkühlen des Lösungsmittels kristallisiert die Verbindung bereits aus. Es wurden 1.0 g der Verbindung erhalten. Schmelzpunkt nach Umkristallisieren aus Ligroin 104-105°C (Kofler).

Zur Darstellung von 2-Hydroxynikotin aus 2-Aminonikotin wird entsprechend verfahren. Ausgehend von 800 mg reinem bei 124-125°C schmelzendem 2-Aminonikotin wurden durch Diazotieren, Verkochen und Extrahieren 80 mg 2-Hydroxynikotin erhalten, das nach Umkristallisieren bei 121-122°C schmolz.

Papierchromatographisch konnten in dem 6-Hydroxynikotin noch Spuren von Aminonikotin nachgewiesen werden. Daher wurde das synthetische 6-Hydroxynikotin noch papierchromatographisch von diesen Verunreinigungen befreit.

Schmelzpunkt nach Umkristallisieren aus Ligroin 106-107°C (Kofler).

8. Razemisierung von 1-Nikotin

10 ml käufliches Nikotin (gefundener Drehwert $[\alpha]_D = -167.9$ werden mit verdünnter Schwefelsäure auf pH 7.0 gebracht (Glaselektrode) und auf 100 ml mit Wasser verdünnt. Diese Lösung wird nach PICTET u. ROTSCHY und SPÄTH u. BRETSCHNEIDER (29) (30) 70 Stunden lang im Einschlussrohr auf 200°C erhitzt. Darauf wird der Inhalt des Bombenrohrs mit Schwefelsäure auf pH 5.2 gebracht und auf dem Dampfbad zu Sirupkonsistenz eingeeengt. Dann wird mit konzentrierter Natronlauge alkalisch gemacht und 7mal mit 30 ml Äther im Scheidetrichter extrahiert. Der Extrakt wird nach Vertreiben des Äthers i.V. fraktioniert, Sdp. 112-113°/12 Torr.

Drehwert nach der Razemisierung $[\alpha]_D = -7.3$. Das Nikotin liegt also nach der Behandlung fast vollständig als Razemat vor.

9. Isolierung des Produkts B

Ansatz: 500 µM Phosphatpuffer pH 6.5
15 µM d,1-6-Hydroxynikotin (7.5 µM enzymatisch aktives 6-Hydroxynikotin)

1.3 mg angereichertes Enzym, mit dest. Wasser auf 4.0 ml aufgefüllt.

In einem aliquoten Teil des Gemischs wird die Reaktion spektralphotometrisch bei 296 mµ bis zum Stillstand verfolgt (ca. 150 Minuten). Dann wird der Ansatz gefriergetrocknet, das trockne Pulver mit etwa 3.5 ml reinem 96proz. Äthanol erschöpfend extrahiert bis keine bei 286 mµ absorbierende Substanz mehr in Lösung geht und diese Lösung wie bei der Isolierung des Produkts A beschrieben der Papierchromatographie unterworfen.

Die langsamer laufende Bande, $R_f \approx 0.29$, wird mit dest. Wasser eluiert. Das Eluat (7.5 ml) enthält 5.1 µM des Produkts B (berechnet mit $\epsilon_{286} = 1.6 \cdot 10^7 \text{ l} \cdot \text{cm}^2 / \text{Mol} \cdot \text{cm}^2$).

10. Modifikation der Mikrobestimmung von Ammoniak nach CONWAY (33)

Der Hauptraum eines Warburggefäßes wird mit der Reaktionsmischung:

250 µM Phosphatpuffer pH 6.5,
Enzymlösung (80, 160, 320 γ Protein), sowie
0.5-2.0 µM d,1-6-Hydroxynikotin (siehe S. 31),
Vol. = 2.0 ml

bzw. 250 µM Phosphatpuffer pH 6.5, 0.2 µM 2,6-Dichlorphenol-indophenol, Enzymlösung (200 bzw. 400 γ Protein) und
1.0 bzw. 2.0 µM 1-Nikotin (s.S. 38) Vol. = 2.0 ml.

beschickt, in den Seitenarm werden 1.4 ml gesättigte Kaliumcarbonatlösung gefüllt, während das Zentralgefäß 0.4-0.5 ml 0.005m Salzsäure (p.A.) aufnimmt.

Das Gefäß wird nach der Beschickung dicht verschlossen und vorsichtig gekippt, dabei tritt die gesättigte Karbonatlösung in den Hauptraum und verdrängt Ammoniak aus der Reaktionsmischung.

Wegen der ungünstigen Geometrie der Gefäße war, wie systematische Versuche ergaben, das NH_3 erst nach etwa 12 Stunden bei 38°C quantitativ aus der Reaktionsmischung ausgetrieben und von der Salzsäure absorbiert. Nach dieser Zeit überführt man den Inhalt des Zentralgefäßes (Salzsäure) mit einer Pipette in ein graduiertes Reagensglas, wäscht das Zentralgefäß mit etwa 1.5 ml Wasser nach, versetzt die Lösung mit 1.0 ml frisch vorbereitetem Nessler's Reagens, füllt auf 10.0 ml auf und misst nach 5 Minuten bei 436 m μ im Photometer Eppendorf.

Die Methode wurde mit p.A. Ammoniumsulfat in der Reaktionsmischung geeicht.

Tabelle

Einges. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in μM	ΔE_{436}	$\mu\text{M NH}_3$	wieder gefunden % NH_3
0.10	0.034	0.2	97
0.25	0.090	0.5	93
0.50	0.189	1.0	100
0.75	0.281	1.5	100

11. Isolierung und Kristallisation des Produkts C

Ansatz: 100 μM Nikotin (1.0 ml; 16 mg/ml),
 4000 μM Phosphatpuffer (8.0 ml 0.5m) pH 6.5,
 2.38 mg angereichertes Enzym (0.35 ml),
 dest. Wasser bis zum Endvolumen 30.0 ml

Zu diesem Gemisch werden nach und nach 200 μM 2.6-Dichlorphenolindophenol (wässrige Lösung; 1.0 mg/ml) gegeben. Die Reaktion, die anfangs sehr rasch abläuft, wird, wenn die stöchiometrische Menge ganz zugesetzt ist, sehr langsam. Zu diesem Zeitpunkt fällt der Leucofarbstoff als unlöslicher Niederschlag aus.

Der Niederschlag wird abzentrifugiert. Die nur sehr schwach gefärbte Lösung wird 30 Minuten lang mit Ather perforiert, wobei alles Dichlorphenolindophenol

in den Äther geht, während das Produkt C unter den Bedingungen der Perforation (pH 6,5) in der wässrigen Phase verbleibt. Das Protein befindet sich denaturiert in der Trennschicht Äther Wasser. Der in der wässrigen Lösung enthaltene Äther wird mit Stickstoff verjagt und die Lösung gefriergetrocknet. Das trockne Pulver (etwa 700 mg) wird mit reinem 96proz. Äthanol so oft extrahiert, bis ein Tropfen des Alkoholextrakts auf ein Filterpapier gebracht unter der UV-Lampe keinerlei Absorption mehr zeigt.

Der Äthanolextrakt wird auf 5 Bogen Puffer-besprühtem Whatman-I-Papier aufgetragen, wobei etwa 4 mg Substanz/Bogen kommen. Um eine scharfe Trennung zu erhalten, wird 16 Stunden mit dem üblichen Fließmittel chromatographiert. Die im gefilterten UV-Licht dunklen Banden des Produkts C werden mit destilliertem Wasser eluiert. Das Eluat wird gefriergetrocknet. Der Extrakt wird nun zur Abtrennung von Natriumacetat auf ausgewaschenem S u. S 2043a-Papier mit wassergesättigtem Butanol als Fließmittel rechromatographiert. Das Produkt C läuft in diesem System mit einem R_f -Wert von ca. 0.3. Die Bande wird mit Wasser eluiert und das Eluat gefriergetrocknet (7 mg). Gibt man zu 7.0 mg 0.4 ml reinen 96proz. Alkohol und erhitzt das Gemisch auf dem Wasserbad zum Sieden, so geht die Substanz völlig in Lösung. Beim Abkühlen kristallisiert die Verbindung in schönen, farblosen Nadeln aus. Schmp. nach zweimaligem Umkristallisieren 256°C (Kofler).

Analyse:

(C ₁)	3.375 mg Substanz	7.625 mg CO ₂	1.960 mg H ₂ O
(C ₂)	1.632 mg Substanz	3.720 mg CO ₂	0.960 mg H ₂ O
(C ₃)	2.560 mg Substanz	5.810 mg CO ₂	1.440 mg H ₂ O
(C ₄)	2.538 mg Substanz	0.349 ccm N ₂ bei 23°C u. 708 Torr	

Substanz verbrennt ohne Rückstand

C₁₀H₁₄N₂O₂ (194.2)

Ber.		C	61.84	H	7.28	N	14.43	O	17.45
Gef.	(C ₁)	C	61.65	H	6.50	N	14.77	aus der	
	(C ₂)	C	62.20	H	6.58			Differenz	
	(C ₃)	C	61.93	H	6.29				

12. Freisetzung der Alkaloidbasen aus kleinsten Mengen ihrer Pikrate

Für die Untersuchung der Enzymspezifität wurde Nornikotin und Myosmin benötigt. Es standen nur wenige Milligramm der betreffenden Pikrate zur Verfügung. Sie wurden mit Hilfe des Anionenaustauschers Dowex 2 (OH-Form) zerlegt.

Dazu werden die in kaltem Wasser unlöslichen Pikrate mit dem 100fachen Gewicht an Austauscherharz (8 mg/0.8 ml) kräftig verrührt, wobei das suspendierte unlösliche Pikrat verschwindet und das Harz braungelbe Farbe annimmt. Der Überstand enthält die freie Base. Es empfiehlt sich, das abgetrennte Harz mit wenig Wasser nachzuwaschen.

Ausbeute an freier Alkaloidbase nahezu quantitativ. Zur spektralphotometrischen Bestimmung des Myosmins wurde der bei SWAIN, ABNER und WOODWARD (55) angegebene Extinktionskoeffizient

$$\epsilon_{234} = 10.1 \cdot 10^6 \text{ [cm}^2/\text{Mol]} \text{ (in wässriger Lösung)}$$

benützt. Verwendeter Extinktionskoeffizient für Nornikotin:

$$\epsilon_{261} = 3.02 \cdot 10^6 \text{ [cm}^2/\text{Mol]} \text{ (in wässriger Lösung)}$$

13. Chemische Synthese von N-Methylmyosmin

a) Darstellung von 1-Methyl-3-Nikotinoyl-2-Pyrrolidon

Nach SPÄTH u. BRETSCHNEIDER (35) wird N-Methylpyrrolidon unter der katalytischen Wirkung von absolutem Natriumäthylat mit Nikotinsäureäthylester zu 1-Methyl-3-Nikotinoyl-2-Pyrrolidon kondensiert. Dieses Keton wird im Bombenrohr mit konzentrierter Salzsäure zu N-Methylmyosmin umgesetzt.

Absolutes Natriumäthylat wurde nach der Vorschrift von BRÜHL und BILZ (51) (58) durch Umsetzung der berechneten Menge Alkohol mit, unter heissem Xylol gepulvertem Natrium hergestellt.

Zu 10 g alkoholfreiem Natriumäthylat in 20 ml absolutem Benzol werden 10.7 g frisch destilliertes N-Methylpyrrolidon (Th. Schuchardt) und 16.4 g Nikotinsäureäthylester (Th. Schuchardt) gegeben. Nach 24stündigem Stehen wird die breiig gewordene Masse 8 Stunden lang auf der Schüttelmaschine geschüttelt und dann nach Zugabe von 10 ml wasserfreiem Benzol 8 Stunden lang im Ölbad zum Sieden erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird mit 10mal Eisessig und 40 ml Wasser versetzt. Ohne das Benzol vorher abzutrennen, wird das Gemisch 10mal mit 30 ml Chloroform ausgeschüttelt. Der nach dem Abdampfen der leichtflüchtigen Anteile verbleibende Rückstand wird im Hochvakuum destilliert. Bei 154-160°C (0.02 Torr)

gehen 12,3 g des viskosen leicht gelb gefärbten Ketons über. Die Verbindung gab die beschriebene intensive Blaufärbung mit Eisenchloridlösung.

b) Umsetzung zu N-Methylmyosmin (56)

2,5 g des Ketons werden mit 10 ml 12n Salzsäure 3 Stunden lang im Bombenrohr auf 130°C erhitzt. Das Reaktionsprodukt wird alkalisch gemacht und mit Äther extrahiert. Nach Abziehen des Äthers geht das N-Methylmyosmin bei 70-74°C/0,4 Torr über.

Ausbeute 1,0 g.

Diese Verbindung gibt mit Eisenchloridlösung keine Farbreaktion mehr.

Zusammenfassung

Die Umwandlung des Nikotins durch zellfreien Extrakt aus *Arthrobacter oxydans*, einem Bakterienstamm, der auf Nikotin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle wachsen kann, wurde studiert.

Es ergab sich, dass die zellfreie Oxydation des Nikotins durch Methylenblau oder 2,6-Dichlorphenolindophenol erreicht werden kann.

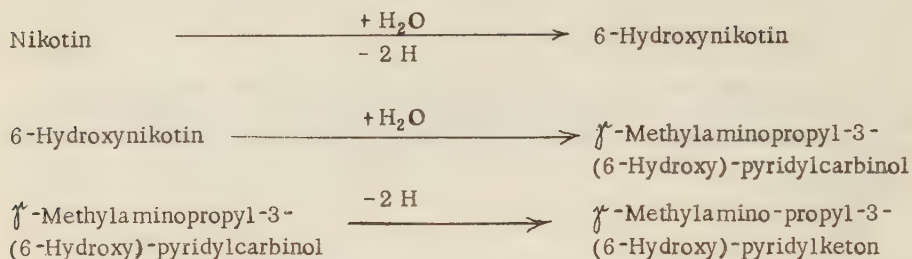
Die photometrisch zu messende Reduktion des 2,6-Dichlorphenolindophenols liess sich zur quantitativen Bestimmung des Enzymsystems der Nikotinoxidation heranziehen und ermöglichte die Ausarbeitung eines Reinigungsverfahrens, das zu einer 16fachen Anreicherung führte.

Bei der Oxydation des Nikotins mit 2,6-Dichlorphenolindophenol und dem gereinigten Enzymsystem oder zellfreiem Extrakt werden 2 Mol Farbstoff pro Mol Nikotin verbraucht. Bei dieser Reaktion treten 3 Produkte auf, die mit Hilfe der papierchromatographischen Methode isoliert wurden.

Das erste Oxydationsprodukt (A) konnte durch Vergleich mit authentischem Material als 6-Hydroxynikotin einwandfrei identifiziert werden. Wie sich auf optischem Weg zeigen liess, wird es in einer nichtoxydativen Reaktion in das zweite Produkt (B) umgewandelt, das dann unter Verbrauch eines weiteren Mols Farbstoff abermals oxidiert wird.

Da die Eigenschaften des Endproduktes mit γ -Methylaminopropyl-3-(6-Hydroxy)-pyridylketon übereinstimmen, kommt dem zweiten Produkt wahrscheinlich die Konstitution des γ -Methylaminopropyl-3-(6-Hydroxy)-pyridylcarbinol zu.

Für die Oxydation des Nikotins wurde die Reaktionsfolge



vorgeschlagen, wobei jeder Schritt durch ein spezifisches Enzym katalysiert wird.

Untersuchungen zur Substratspezifität des Enzyms zeigten, dass an Stelle des Nikotins auch analoge Verbindungen wie Anabasin und Normikotin in die 6-Hydroxy-Verbindung übergeführt werden.

Auch Myosmin und N-Methyl-Myosmin werden oxydiert, wobei im Falle des N-Methyl-Myosmins unter Verbrauch von einem Mol Farbstoff das gleiche Produkt entsteht, wie bei der Oxydation des Nikotins.

Literaturverzeichnis

1. Eberwein, H. ^v Diplomarbeit München 1959
2. Werle, E. Arzneimittelforschung 5, 265 (1956)
Schievelbein, H. 6, 322 (1956)
Spieth, D.
3. Frankenburg, W.G. Ind.Eng.Chem. 44, 301 (1952)
Gottscho, A.M.
Vaitekunas, A.A.
4. Frankenburg, W.G. J.Amer.chem.Soc. 77, 5730 (1955)
Gottscho, A.M.
Vaitekunas, A.A.
Zacharius, R.M.
5. Frankenburg, W.G. J.Amer.Chem.Soc. 79, 149 (1957)
Gottscho, A.M.
Vaitekunas, A.A.
6. Frankenburg, W.G. J.Amer.chem.Soc. 74, 4309 (1952)
Gottscho, A.M.
Vaitekunas, A.A.
7. Frankenburg, W.G. Arch.Biochem.Bioph. 58, 509 (1955)
Vaitekunas, A.A.
8. Wenusch, A. Z.Lebensm.Unters.Forsch. 84, 498 (1942)
9. Casida, L.E. J.of Bacteriol. 75, 474 (1958)
Rosenfield, R.
10. Bucherer, H. Zentrbl.Bakt.Abt.II. 105, 166, 445 (1942)
11. Tabuchi, T.J. Agr.chem.Soc.Japan 29, 222 (1955)
12. Wada, E. J.Amer.chem.Soc. 76, 155 (1954)
Yamasaki, K.
13. Wada, E. Arch.Biochem.Bioph. 64, 244 (1956)
14. Wada, E. Arch.Biochem.Bioph. 62, 471 (1956)
15. Wada, E. Arch.Biochem.Bioph. 72, 154 (1957)
16. Hylin, J. W. Arch.Biochem.Bioph. 83, 528 (1959)

17. Hochstein, L.J. J.biol.Chem. 234, 151 (1959)
Rittenberg, S.C.
18. Hochstein, L.J. J.biol.Chem. 234, 156 (1959)
Rittenberg, S.C.
19. Warburg, O. Biochem.Z. 254, 438 (1932)
Christian, W.
20. Schlossmann, K. Biochem.Z. 329, 332 (1957)
Merkenschlager, M.
Kurz, W.
21. Warburg, O. Biochem.Z. 310, 384 (1941)
Christian, W.
22. Kunitz, M. J.Gen.Physiol. 35, 423 (1952)
23. Seubert, W. Dissertation München 1955
24. Jatzkewitz, H. Z.Physiol.Chem. 292, 94 (1953)
25. Leiserson, L. Anal.Chem. 27, 1129 (1955)
Walker, T.B.
26. König, J. J.prakt.Chem. 83, 406 (1911)
27. Kuffner, F. Monatshefte d. Chem. 86, 995 (1955)
Faderl, N.
28. Tschitschibabin, A.E. Ber.dtsch.chem.Ges. 57, 1163 (1924)
Krissanow, A.W.
29. Pictet, A. Ber.dtsch.chem.Ges. 33, 2353 (1900)
Rotschy, A.
30. Späth, E. Ber.dtsch.chem.Ges. 61, 333 (1928)
Bretschneider
31. Grassmann, W. Liebig Ann.Chem. 519, 192 (1935)
v. Arnim, K.
32. Wieland, Th. Angew. Chem. 69, 199 (1957)
Pfleiderer, G.
33. Conway, E.J. wiedergegeben in
Kenten, R.H. Gasometric Analysis in Plant Investiga-
tion, in: Moderne Methoden d. Pflanzen-

analyse Vol. I, S. 438 K. Peach and
M.V. Tracey Springer Verlag Berlin 1956

34. Hörmann H. Angew.Chem. 68, 601 (1956)
35. Späth, E. Ber.dtsch.chem.Ges. 61, 327 (1928)
Bretschneider
36. Haines, P.G. J.Amer.chem.Soc. 72, 1719 (1950)
Eisner, A.
37. Wieland, H. Liebig.Ann.Chem. 477, 32 (1930)
Rosenfeld, B.
38. Wieland, H. Oppenheimer Handb. d.Biochem. 2,
271 (1923)
39. Behrmann, E.J. J.biol.Chem. 228, 923 (1957)
Stanier, R.y.
40. Hunt, A.L. Biochem.J. 66, 20 (1957)
Hughes, D.E.
Löwenstein, I.M.
41. Hunt, A.L. Biochem.J. 69, 170 (1958)
Hughes, D.E.
Löwenstein, I.M.
42. Lemon, H.W. J.Amer.chem.Soc. 69, 2999 (1947)
43. Doub, L. J.Amer.chem.Soc. 69, 2715 (1947)
Vanderbelt, J.M.
44. Newman, N.S. Steric Effects Organic Chemistry
J.Wiley and sons, 1956 p. 68
45. Read, J. J.chem.Soc. 308 (1934)
Walker, J.
46. Snyder J.Amer.Chem.Soc. 71, 291 (1949)
Brewster
47. Bücher, Th. Z.Naturforsch. 8b, 555 (1953)
Beisenherz, G.
Boltze, H.J.
Czok, R.
Garbade, K.H.
Meyer-Arendt, E.
Pfleiderer, G.

48. Kuffner, F. Monatshefte d.Chem. 87, 749 (1956)
Schick, K.
Buhn, H.
49. Porter, W.L. Arch.Biochem. 24, 461 (1949)
Naghski, J.
Eisner, A.
50. Tso, T.C. Arch.Biochem.Biophys. 43, 269 (1953)
Jeffrey, R.N.
51. Wegner, E. Naturwiss. 40, 580 (1953)
52. Werle, E. Naturwiss. 38, 333 (1950)
Koch, J.
53. Munier, R. Bull.Soc.Chim.Biol. 33, 846 (1951)
Macheboeuf, M.
54. Cramer, F. "Papierchromatographie" 2. Aufl.
S. 43 Verlag Chemie, Weinheim Berg-
strasse. 1953
55. Swain, L.M. J.Amer.chem.Soc. 71, 1341 (1949)
Eisner, A.
Woodward, C.F.
Brice, B.A.
56. Späth, E. Ber.dtsch.chem.Ges. 71, 100 (1938)
Wibaut, J.P.
Keszler, F.
57. Brühl, J. W. Ber.dtsch.chem.Ges. 35, 3516 (1902)
Biltz, H.
58. Brühl, J. W. Ber.dtsch.chem.Ges. 24, 650 (1891)
Biltz, H.

Lebenslauf

Am 18. Januar 1930 wurde ich in München als Sohn des Kaufmanns Gustav Eberwein und seiner Ehefrau Gabriele Eberwein geb. Grün geboren.

Vom April 1936 bis März 1940 besuchte ich die Volksschule und anschliessend das Alte Realgymnasium München, von dem ich im Juli 1948 das Reifezeugnis erhielt.

Im Wintersemester 1948/49 begann ich an der Technischen Hochschule München mit dem Studium der Physik, wechselte im Sommersemester 1949 zu der Universität München über und begann mit dem Chemiestudium. Im November 1951 legte ich die Diplom-Vorprüfung und im Oktober 1954 die Diplom-Hauptprüfung für Chemiker ab. Von November 1954 bis Juli 1956 führte ich die Diplomarbeit und anschliessend die Doktorarbeit unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Lynen aus.

